

MARIA INÊS FELIZARDO ROQUE DO VALE

**TERAPÊUTICA DE CÉLULAS ESTAMINAIS NA
OSTEOARTRITE GRAVE EM CÃES**

Orientadora: Professora Doutora Rute Teixeira

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
LISBOA
2022**

MARIA INÊS FELIZARDO ROQUE DO VALE

**TERAPÊUTICA DE CÉLULAS ESTAMINAIS NA
OSTEOARTRITE GRAVE EM CÃES**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 14 de julho de 2022, com o Despacho de Nomeação Nº 243/2022, 23 de junho de 2022, com a seguinte:

Presidente: Prof^a. Doutora Sofia Van Harten, por delegação da Prof^a. Doutora Laurentina Pedroso;

Arguente: Prof^a. Doutora Joana Catita

Orientadora: Professora Doutora Rute Teixeira

Coorientadora: Mestre Ângela Martins (membro não integrante do Júri)

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

LISBOA

2022

Agradecimentos

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e a todos os docentes que me acompanharam ao longo de todo o curso, transmitindo da melhor forma que conseguiam todos os conhecimentos, profissionalismo e partilhas de experiências.

À Dr^a Ângela Martins, minha coorientadora, agradeço por me ter aceitado no Hospital Veterinário da Arrábida e no Centro de Reabilitação e Regeneração Animal de Lisboa, por todo o conhecimento que me transmitiu e por toda a disponibilidade, o esforço, a dedicação e o apoio que sempre demonstrou para que esta dissertação fosse realizada da melhor forma. Agradeço também os valores transmitidos quer a nível profissional como pessoal, tendo-me possibilitado integrar a equipa do seu hospital ao longo do estágio curricular e muito mais para além disso, tendo aberto as portas de sua casa e conhecer parte da sua família.

À Professora Doutora Rute Teixeira, minha orientadora, por toda a disponibilidade e dedicação que demonstrou ao longo desta etapa e por todo o apoio e valorização do trabalho, tornando sempre os meus pensamentos, nos melhores, fazendo acreditar que iria concluir esta dissertação com sucesso e que todo o esforço valeria a pena.

À Dr^a Débora Gouveia e à Dr^a Carla Carvalho, pela troca de mensagens, por toda a ajuda e por tentarem resolver sempre tudo da melhor forma, encontrando uma solução prática para todas as combinações.

A toda equipa HVA/CRAA/CR²AL, por todo o tempo que cada um perdeu comigo a explicar cada coisa, por toda a paciência, profissionalismo, dedicação, determinação e, acima de tudo, gosto pelo que exercem, que sempre demonstraram.

Aos meus pais por todo o apoio, carinho, investimento e dedicação envolvidos. Em especial à minha mãe pela paciência e pela calma que sempre me transmitiu, com o seu jeito para suavizar o que parece ser mais tenebroso. Em especial ao meu pai pelo seu perfeccionismo, jeito e conhecimento científico, capacidade de síntese e por ser realista. Sempre dispostos, ambos, a ajudar da melhor forma, tendo acreditado sempre no trabalho que sairia de todo o esforço envolvido.

Ao Daniel Francisco (RF), por ter estado sempre ao meu lado, a aturar as minhas crises de ansiedade e de desespero, tentando sempre atenuar tudo da melhor forma e fazer-me ver que

não estaria a passar por uma tempestade, mas sim por um mais uma etapa trabalhosa que mais tarde iria dar dos melhores frutos, pela satisfação de exercer aquilo com que sempre sonhei, Medicina Veterinária, ajudando quem mais gosto de ajudar. Pelo tempo passado a ver vídeos no Youtube para descobrir como fazer as formatações da melhor forma. Nunca me deixou desistir, nem baixar os braços, ajudou-me sempre a enfrentar todas as dificuldades e a ultrapassá-las.

Ao meu irmão pelos conselhos e opiniões, pelas ajudas mais técnicas e também pelas chamadas de atenção e choques de realidade.

Ao resto da família pela preocupação e interesse que sempre demonstraram.

Aos meus colegas e amigos de curso, por permitirem momentos agradáveis, experiências novas, videochamadas de ajuda pré-frequências, momentos de loucura partilhados e muito mais.

À Cuca e ao Patusco pela companhia que sempre fizeram, a dormir na cadeira ao meu lado, na secretária, a transmitir as melhores energias enquanto eu escrevia o que tinha a escrever na dissertação.

À Nina e à Wendy por permitirem umas escapadelas de descanso, intervalos de brincadeira para depois retornar a escrita da dissertação com mais ânimo e leveza.

Resumo

A osteoartrite é uma doença crónica multifatorial resultante de alterações da homeostase, que condiciona a capacidade funcional do doente. O presente estudo pretende comprovar a tolerância, a eficácia, a repetibilidade e a segurança do protocolo multimodal de modalidades de reabilitação funcional e medicina regenerativa por células estaminais nesta doença.

Oito cães (n=8) foram selecionados no período entre 14 de setembro de 2020 e 15 de dezembro de 2021 e com média de idades de 9,5 anos e de peso vivo 35,63Kg, com osteoartrite coxofemoral ou femuro-tibio-patelar e com dor e claudicação graves.

Todos foram avaliados em consulta de reabilitação e regeneração, incluindo a realização do exame de reabilitação funcional, avaliação de graus de dor e claudicação, medição de amplitude articular e massa muscular. Foram administradas, intra-articularmente, células estaminais alogénicas da membrana sinovial com aplicação de ondas choque e laserterapia classe IV. A monitorização realizou-se no momento da admissão, ao fim do 7º e 14º dia da administração das células estaminais, com consultas de seguimento após 30, 90, 180, 270 e 365 dias.

No estudo constatou-se uma melhoria em todos os parâmetros avaliados, tendo-se observado que, em F5, n=4 apresentaram dor e claudicação ligeiras e n=8 melhoraram a amplitude articular e massa muscular, obtendo, por isso, qualidade de vida até, pelo menos 365 dias.

A aplicação do presente protocolo multimodal sugere redução de ambas as escalas, podendo-se concluir que este mantém a qualidade de vida a longo termo. Contudo, sendo a amostra reduzida, serão necessários mais estudos para avaliar a potencialidade do protocolo apresentado.

Palavras-chave: Osteoartrite; Cães; Células Estaminais Mesenquimatosas; Dor; Reabilitação.

Abstract

Osteoarthritis is a chronic multifactorial disease resulting from changes in homeostasis, leading to the functional disability. The present study intends to prove the tolerance, the efficacy, the repeatability and the safety of the multimodal protocol of functional rehabilitation and stem cell regenerative medicine modalities in this disease.

Eight dogs (n=8) were selected in the period between September 14, 2020 and December 15, 2021 and with mean age of 9.5 years-old and body weight of 35.63 kg, with coxofemoral or femoro-tibio-patellar osteoarthritis and severe pain and claudication.

All were evaluated in animal rehabilitation and regeneration appointments composed of functional rehabilitation examination, assessment of degrees of pain and lameness, measurement of joint amplitude and muscle mass. Allogeneic stem cells from the synovial membrane were administered intra-articularly with the administration of shock waves and class IV lasertherapy. Monitoring was completed at admission, after the 7th and 14th day after stem cell administration, and follow-ups after 30, 90, 180, 270 and 365 days.

In the study there was an improvement in all parameters evaluated, and it was observed that, in F5, n=4 had mild pain and claudication and n=8 had improved joint amplitude and muscle mass, thus improving their quality of life up to, at least, 365 days.

The present multimodal protocol suggests a reduction in pain and claudication scales and it can be concluded that quality of life can be maintained in the long term. However, due to the reduced number of participants more studies should be completed to further evaluate the protocol presented.

Keywords: Osteoarthritis; Dogs; Mesenchymal Stem cells; Pain; Rehabilitation

Lista de Abreviaturas

°: Graus

µm: Micrómetros

AD-MSC: Células Estaminais Mesenquimais do Tecido Adiposo, do inglês '*Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells*'

AINEs: Anti-inflamatórios Não Esteroidais

AVC: Acidente Vascular Cerebral

BM-MSC: Células Estaminais Mesenquimais da Medula Óssea, do inglês '*Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*'

CAM: Concentração Alveolar Mínima

CCL: Ligamento Cruzado Cranial, do inglês '*Cranial Cruciate Ligament*'

CM: Centímetros

CODI: Índice de Incapacidade Ortopédica de Cincinnati, do inglês '*Cincinnati Orthopedic Disability Index*'

COX-2: Ciclooxygenase-2

CR²AL: Centro de Reabilitação e Regeneração Animal de Lisboa

CRAA: Centro de Reabilitação Animal da Arrábida

DPBS: '*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*'

ECM: Matriz extracelular cartilaginosa, do inglês '*Cartilaginous Extracellular Matrix*'

ECU: Células Estaminais Fetais do Cordão Umbilical

EH: Células Estaminais Hematopoiéticas

EN: Células Estaminais Neurais

ESCs: Células Estaminais Embrionárias, do inglês '*Embryonic Stem Cells*'

Et al.: E outros, da locução latina '*et alli*'

F: Consulta de seguimento, do inglês '*Follow-up*'

HA: Ácido Hialurónico, do inglês '*Hyaluronic acid*'

HCPI: Índice de dor crónica Helsinki, do inglês '*Helsinki Chronic Pain Index*'

HVA: Hospital Veterinário da Arrábida

ICETA: Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente da Universidade do Porto

ICM: Massa Celular Interna, do inglês '*Internal Cell Mass*'

IL-1: Interleucina-1

IL-6: Interleucina-6

iPSCs: Células Estaminais Pluripotentes Induzidas, do inglês '*Induced Pluripotent Stem Cells*'

IV: Intravenoso

J: Joules

KG: Quilogramas

LASER: *'Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation'*

MDCT: Tomografia Computadorizada com Múltiplos Detetores, do inglês *'Computed Tomography with Multiple Detectors'*

MG: Miligramas

ML: Mililitros

MM: Milímetros

MRI: Imagem por Ressonância Magnética, do inglês *'Magnetic Resonance Imaging'*

MSCs: Células Estaminais Mesenquimais, do inglês *'Mesenchymal Stem Cells'*

NK: *'Natural Killer'*

NM: Nanómetros

NRS: Escala de Classificação Numérica, do inglês *'Numerical Rating Scale'*

OA: Osteoartrite

PGE 2: Prostaglandina E2

PRP: Plasma Rico em Plaquetas

RFP: Reabilitação Funcional Positiva

ROM: Amplitude do Movimento Articular, do inglês *'Range of Motion'*

RPM: Rotações Por Minuto

SDS: Escala Descritiva Simples, do inglês *'Simple Descriptive Scale'*

SM-MSCs: Células Mesenquimais da Membrana Sinovial, do inglês *'Mesenchymal Cells of the Synovial Membrane'*

SNC: Sistema Nervoso Central

TC: Tomografia Computadorizada

TJR: Substituição Total da Articulação, do inglês *'Total Joint Replacement'*

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral-Alfa, do inglês *'Tumor Necrosis Factor-Alpha'*

ULHT: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

VAS: Escala Visual Analógica, do inglês *'Analogic Visual Scale'*

Índice Geral

Índice Geral	7
Índice de Tabelas	10
Índice de Figuras.....	12
Índice de Gráficos.....	14
I - Relatório Descritivo Do Estágio	15
II – Revisão Bibliográfica.....	21
1. Introdução.....	21
1.1. Caracterização E Fisiopatologia Da Osteoartrite.....	21
1.2. Etiologia Da Osteoartrite	23
1.3. Sinais Clínicos E Diagnóstico Da Osteoartrite	24
1.4. Fenómeno Da Dor	26
1.4.1. Tipos de Dor.....	28
1.4.2. Avaliação clínica da dor	29
1.5. Tratamento Da Osteoartrite	30
1.5.1. Maneio Não Farmacológico	30
1.5.2. Maneio Farmacológico.....	30
1.5.2.1. Maneio Farmacológico Convencional.....	30
1.5.2.2. Maneio Farmacológico Biológico	31
1.5.3. Abordagem Cirúrgica	32
1.6. Modalidades Da Reabilitação Funcional Com Papel Na Medicina Regenerativa	32
1.6.1. Laserterapia Classe IV	32
1.6.2. Ondas-choque	34
1.6.3. Células Estaminais.....	36
1.6.3.1. Aplicações Da Terapia Com Células Estaminais Em Medicina Veterinária	44
1.6.3.2. Efeitos Secundários Da Aplicação Das Células Estaminais.....	45
1.7. Procedimentos A Efetuar Para A Avaliação Do Efeito Das Células Estaminais	45

1.7.1 Procedimento De Exame De Reabilitação Funcional Dinâmico	45
1.7.2. Procedimento De Exame De Reabilitação Funcional Estático.....	45
1.7.3. Medição Da Amplitude Articular	46
1.7.4. Medição Da Massa Muscular	46
2. Objetivos	46
III – Estudo Clínico	47
1. Materiais e Métodos	47
1.1. Apresentação Dos Participantes Do Estudo	47
1.2. Desenho Do Estudo	48
1.2.1. Procedimentos Efetuados Durante O Estudo.....	53
1.2.1.1. Preparação Das Células	53
1.2.1.1.1. Preparação E Inativação De Soro Autólogo	53
1.2.1.1.2. Preparação Da Dose Desejada De Células Estaminais	54
1.2.1.2. Administração Das Células Intra-Articular	55
1.2.1.3. Procedimento Da Modalidade De Ondas-Choque.....	57
1.2.1.4. Procedimento Da Modalidade De Laserterapia.....	58
1.2.1.5. Monitorização Dos Participantes Do Estudo.....	58
1.3. Recolha De Dados Clínicos.....	59
1.4. Análise Estatística	59
2. Resultados	60
3. Discussão.....	69
4. Conclusão	74
5. Referência Bibliográfica.....	74
Anexos	I
Anexo 1: Sistemas De Classificação Desenvolvidos Para Osteoartrite Canina.....	I
Anexo 2: Escalas De Dor Em Cães.....	II
Anexo 3: Sistemas De Pontuação Do Grau De Claudicação	VII
Anexo 4: Tabelas Comparativas Entre As Diversas Escalas	VIII
Anexo 5: Células Estaminais Hematopoiéticas, Neurais E Fetais Do Cordão Umbilical.....	X
Anexo 6: Diferenças Celulares	XI

Anexo 7: Aprovação Pela Comissão De Ética Da Universidade Lusófona De Humanidades E Tecnologias (ULHT).....	XIII
Anexo 8: Termo De Consentimento Dos Tutores.....	XIV
Anexo 9: Grau De Osteofitose	XV
Anexo 10: Escala De Condição Corporal.	XV
Anexo 11: Exemplo De Análise Microbiológico Das Células Estaminais	XVI
Anexo 12: Tabelas De Identificação Dos Casos	XVI
Anexo 13: Tabela De Identificação Dos Animais Incluídos No Estudo.....	XXIII

Índice de Tabelas

Tabela 1: Distribuição do número total de casos acompanhados tendo em conta a espécie animal.....	16
Tabela 2: Distribuição do número total de casos acompanhados tendo em conta a área clínica.	17
Tabela 3: Distribuição do número de casos de medicina interna acompanhados tendo em conta as suas subáreas clínicas.	18
Tabela 4: Distribuição do número de casos de cirurgia e anestesia acompanhados tendo em conta as suas subáreas clínicas.	19
Tabela 5: Distribuição do número de casos de medicina física e de reabilitação acompanhados tendo em conta as suas subáreas clínicas.	20
Tabela 6: Valores de amplitude de movimento articular normais das articulações coxofemoral e femuro-tibio-patelar.....	26
Tabela 7: Tipos de células estaminais, consoante o potencial de diferenciação.	37
Tabela 8: Dados estatísticos referentes à idade e ao peso vivo dos cães.....	60
Tabela 9: Dados estatísticos referentes à escala de dor dos cães, em T0 e na última consulta de seguimento de cada doente.....	62
Tabela 10: Dados estatísticos referentes à escala de claudicação dos cães em T0 e na última consulta de seguimento de cada doente.....	63
Tabela 11: Evolução de ROM e de Massa Muscular em T0, T2 e na última consulta de seguimento de cada doente.....	64
Tabela 12: Classificação de Osteoartrite, segundo Kellgren e Lawrence	I
Tabela 13: Escalas subjetivas ou unidimensionais.....	VIII
Tabela 14: Escalas objetivas ou multidimensionais - escalas de dor aguda.....	VIII
Tabela 15: Escalas objetivas ou multidimensionais - escalas de dor crónica.....	IX
Tabela 16: Descrição das características e funcionalidades das células estaminais com potencial terapêutico que não são o foco da dissertação.	X
Tabela 17: Diferenças entre células autólogas e células alogénicas.....	XI
Tabela 18: Classificação do grau de osteofitose.....	XV
Tabela 19: Tabela dos casos com variáveis categorizadas.....	XVI
Tabela 20: Legenda da categorização da variável “Idade”.	XVI
Tabela 21: Legenda da categorização da variável “Peso Vivo”.....	XVI
Tabela 22: Legenda da categorização da variável “Condição Corporal”.....	XVI

Tabela 23: Legenda da categorização da variável “Género”.....	XVII
Tabela 24: Legenda da categorização da variável “Raça”.	XVII
Tabela 25: Legenda da categorização da variável “Localização da Lesão”.....	XVII
Tabela 26: Tabela das escalas de dor e de claudicação à entrada e à saída dos casos em estudo.	XVII
Tabela 27: Legenda da categorização da Classificação final da dor.	XVII
Tabela 28: Legenda da categorização da Classificação final da claudicação.	XVIII
Tabela 29: Tabela com as medições do ROM em flexão e extensão ao longo do tempo dos casos em estudo.	XVIII
Tabela 30: Tabela com as medições da Massa Muscular ao longo do tempo dos casos em estudo.	XXI
Tabela 31: Identificação dos animais incluídos no estudo.	XXIII

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da doença articular degenerativa	21
Figura 2: Diagrama da via da dor.....	27
Figura 3: Diversas funções das células estaminais adultas	39
Figura 4: Diferentes fontes e potencial de diferenciação das células estaminais derivadas da membrana sinovial	41
Figura 5: Mecanismos que permitem às células reparar e regenerar tecidos lesados	42
Figura 6: Organograma do estudo preliminar Coorte prospetivo da aplicação de protocolos multimodais de reabilitação funcional e regeneração em cães com osteoartrite grave.....	50
Figura 7: Representação fotográfica do goniómetro manual utilizado para as medições da amplitude articular (ROM)	51
Figura 8: Representação fotográfica da fita Gulick tipo II utilizado para as medições da massa muscular	51
Figura 9: Medição da amplitude articular em flexão com goniómetro na articulação coxofemoral (a) e na articulação femuro-tibio-patelar (b). Medição da massa muscular com a fita Gulick tipo II (c).....	52
Figura 10: Representação fotográfica da máquina de radiografia utilizada para recolha de imagens radiográficas.....	52
Figura 11: Representação fotográfica da máquina de radiografia utilizada para recolha de imagens radiográficas.....	52
Figura 12: Representação fotográfica da câmara de fluxo-laminar utilizada.....	54
Figura 13: Representação fotográfica da centrifuga utilizada.....	54
Figura 14: Representação fotográfica do filtro utilizado	54
Figura 15: Representação fotográfica do material necessário para a preparação de dose de células estaminais	55
Figura 16: Representação fotográfica do material necessário para a preparação de dose de células estaminais	55
Figura 17: Administração das células estaminais na articulação coxofemoral no cão	55
Figura 18: Diagrama do procedimento intra-articular desde a preparação das células até à sua administração	57
Figura 19: Equipamento PulseVet para modalidade de reabilitação de ondas	57
Figura 20: Procedimento terapêutico de ondas-choque na articulação coxofemoral do cão. .	57
Figura 21: Aparelho utilizado nas sessões de laserterapia classe IV	58

Figura 22: Evolução da escala de dor ao longo do estudo	61
Figura 23: Evolução da escala de claudicação ao longo do estudo.....	62
Figura 24: Representação esquemática do número de animais ao longo dos diversos momentos temporais	67
Figura 25: Classificação radiológica de osteoartrite de Keellgreen e Lawrence.	I
Figura 26: Escala Visual Analógica (VAS)	II
Figura 27: Escala de Dor da Universidade de Melbourne	III
Figura 28: Escala composta de dor de Glasgow – Forma abreviada	IV
Figura 29: Escala de Dor da Universidade de Colorado – para dor aguda	V
Figura 30: Escala de Dor da Universidade de Colorado – para dor Crónica	VI
Figura 31: Canine Brief Pain Index	VII
Figura 32: Pontuação de grau de claudicação	VII
Figura 33: Sistema de pontuação de grau de claudicação: em estação, passo e trote	VII
Figura 34: Documento de aprovação pela comissão de ética da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT).	XIII
Figura 35: Documento representativo do consentimento dos tutores.	XIV
Figura 36: Imagem representativa da escala de condição corporal utilizada.	XV
Figura 37: Exemplo de análise microbiológico das células estaminais.	XVI

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Percentagem de casos acompanhados tendo em conta a espécie animal.	16
Gráfico 2: Percentagem de casos acompanhados tendo em conta a área clínica.	17
Gráfico 3: Percentagem de casos de medicina interna acompanhados tendo em conta as suas subáreas clínicas.	19
Gráfico 4: Média do ROM (flexão/extensão) dos cães que administraram células estaminais na articulação coxofemoral	65
Gráfico 5: Média do ROM (flexão/extensão) dos cães que administraram células estaminais na articulação Femuro-tibio-patelar	65
Gráfico 6: Média da Massa Muscular dos cães que administraram células estaminais na articulação Coxofemoral	66
Gráfico 7: Massa Muscular dos cães que administraram células estaminais na articulação Femuro-tibio-patelar.....	66
Gráfico 8: Média de escala de dor dos cães ao longo do estudo	68
Gráfico 9: Média de escala de claudicação dos cães ao longo do estudo	68

I - Relatório Descritivo Do Estágio

O presente relatório refere-se ao estágio curricular de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária realizado no Hospital Veterinário da Arrábida (HVA), no Centro de Reabilitação Animal da Arrábida (CRAA) e no Centro de Reabilitação e Regeneração Animal de Lisboa (CR²AL), entre as datas 14 de setembro de 2020 e 15 de janeiro de 2021, tendo completado um total de 796 horas em cerca de 4 meses de estágio.

Este estágio permitiu à autora acompanhar de perto as diversas áreas da Medicina Veterinária de animais de companhia, incluindo as áreas de medicina interna (tanto no internamento, como em consultas externas), medicina preventiva, cirurgia e anestesia, medicina de urgência e a que maior impacto teve: medicina física e de reabilitação, visto se tratar de um hospital/centro referência desta área especificamente, em que muitos casos são referenciados e direcionados para os HVA/CRAA/CR²AL. Além desta, também a medicina de exóticos se pôde incluir, mas tendo em conta que foi apenas acompanhado um só caso, esta área não se destacará neste relatório.

Dentro da área de medicina interna, esta subdividiu-se em casos de Oftalmologia, Cardiologia, Oncologia, Ortopedia, Doenças Infeciosas e Parasitárias, Dermatologia, Endocrinologia, Neurologia, Gastroenterologia, Ginecologia e Obstetrícia, Urologia e Nefrologia e Toxicologia, sendo todas elas complementadas com auxílio da imagiologia, nomeadamente ecografia abdominal e/ou torácica, ecocardiografia, eletrocardiografia, radiografia, endoscopia, ressonância magnética e tomografia computadorizada.

Durante os quatro meses foi possível seguir toda a rotina do hospital, tendo podido participar nas diversas tarefas relativas a cada área, proporcionando por um lado a consolidação de todas as valências aprendidas na faculdade e em outros estágios – nomeadamente os extracurriculares –, como também permitiu ganhar maior experiência e prática clínica, alargando os conhecimentos e matérias da autora.

A Medicina Física e de Reabilitação foi sem dúvida a área que mais se destacou, não só pelo facto de ser uma área relativamente recente e do local de estágio ser dos poucos onde é realizada com todo o tipo de equipamentos, como também o facto de ser a área de interesse da autora. Mais especificamente no CRAA e no CR²AL foi permitido o acompanhamento de todo o tipo de procedimentos, desde as modalidades de laserterapia, ultrassonografia, diatermia, electroestimulação, até ao acompanhamento dos animais tanto no tapete rolante terrestre, como

no aquático. Além disso, foi ainda possível registar casos de animais que utilizaram a câmara hiperbárica, assim como outros que beneficiaram da infiltração de células estaminais – tendo este último incidido precisamente na base do tema desta dissertação de mestrado.

Por forma a facilitar a interpretação da casuística assistida tanto no HVA, como no CRAA e no CR²AL, os dados dos casos totais que a autora acompanhou, serão representados em tabelas e gráficos, assim como serão igualmente apresentadas as frequências absoluta e relativa de cada linha das tabelas. É de salientar que os dados são referentes aos casos observados e não ao número total de animais, uma vez que num mesmo animal podem ocorrer doenças concomitantes, levando a que ocorra uma repetição dos dados recolhidos.

Na Tabela 1 e no Gráfico 1 estão distribuídos os casos conforme a espécie animal acompanhada, sendo que os resultados possíveis se dividem em cães, gatos e exóticos. Com base nesta mesma tabela e neste mesmo gráfico verificou-se que no período no qual o estágio decorreu, a autora acompanhou mais casos de cães do que gatos.

Tabela 1: Distribuição do número total de casos acompanhados tendo em conta a espécie animal.

Espécie Animal	Número Absoluto de Casos	Número Relativo de Casos (%)
Cães	918	77,60%
Gatos	264	22,32%
Exóticos	1	0,08%
Total de animais	1183	100%

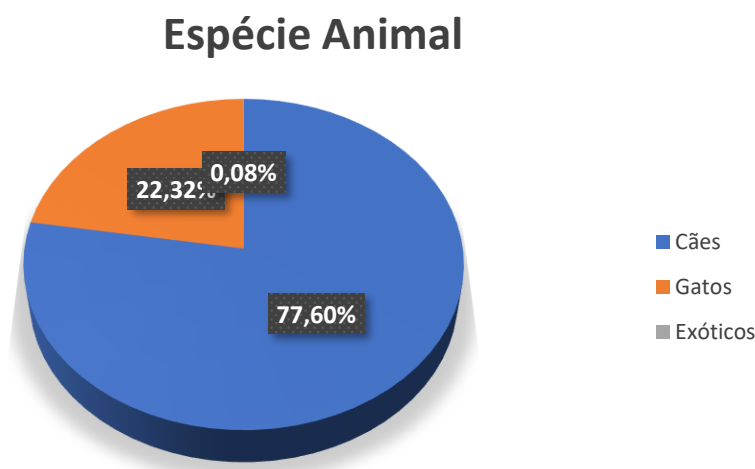


Gráfico 1: Percentagem de casos acompanhados tendo em conta a espécie animal.

Na Tabela 2 e no Gráfico 2 foram distribuídos os casos conforme a área clínica, dentro da Medicina Veterinária: Medicina Interna, Medicina Preventiva, Cirurgia e Anestesia, Medicina de Urgência e Medicina Física e de Reabilitação, tendo em conta a espécie animal. Demonstram-se, ainda, as frequências absoluta e relativa de cada área.

Tabela 2: Distribuição do número total de casos acompanhados tendo em conta a área clínica.

Área Clínica	Cães	Gatos	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Medicina Interna	492	242	734	44,73%
Medicina Preventiva	35	14	49	2,99%
Cirurgia e Anestesia	99	44	143	8,71%
Medicina de Urgência	178	107	285	17,37%
Medicina Física e de Reabilitação	392	38	430	26,20%
Total de casos	1196	445	1641	100%

Área Clínica

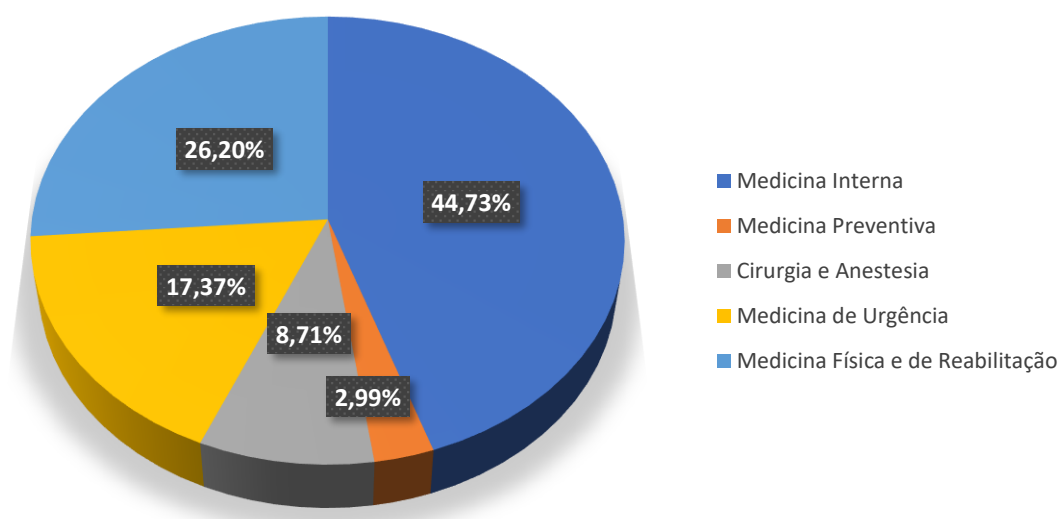


Gráfico 2: Percentagem de casos acompanhados tendo em conta a área clínica.

Dando maior destaque às áreas que maior casuística possuíram, na Tabela 3 e no Gráfico 3 encontram-se representadas as subáreas de Medicina Interna, tendo em conta o número de casos específicos de cada uma dessas subáreas.

Tabela 3: Distribuição do número de casos de medicina interna acompanhados tendo em conta as suas subáreas clínicas.

Medicina Interna	Cães	Gatos	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Oftalmologia	7	2	9	1,23%
Cardiologia	33	19	52	7,08%
Oncologia	36	19	55	7,49%
Ortopedia	127	33	160	21,80%
Doenças Infecciosas e Parasitárias	39	21	60	8,17%
Dermatologia	21	13	34	4,63%
Endocrinologia	15	11	26	3,54%
Neurologia	89	35	124	16,90%
Gastroenterologia	69	23	92	12,53%
Ginecologia e Obstetrícia	10	5	15	2,04%
Urologia e Nefrologia	14	51	65	8,86%
Toxicologia	16	3	19	2,60%
Estomatologia/Odontologia	2	0	2	0,27%
Pneumologia	14	7	21	2,86%
Total de casos	492	242	734	100%

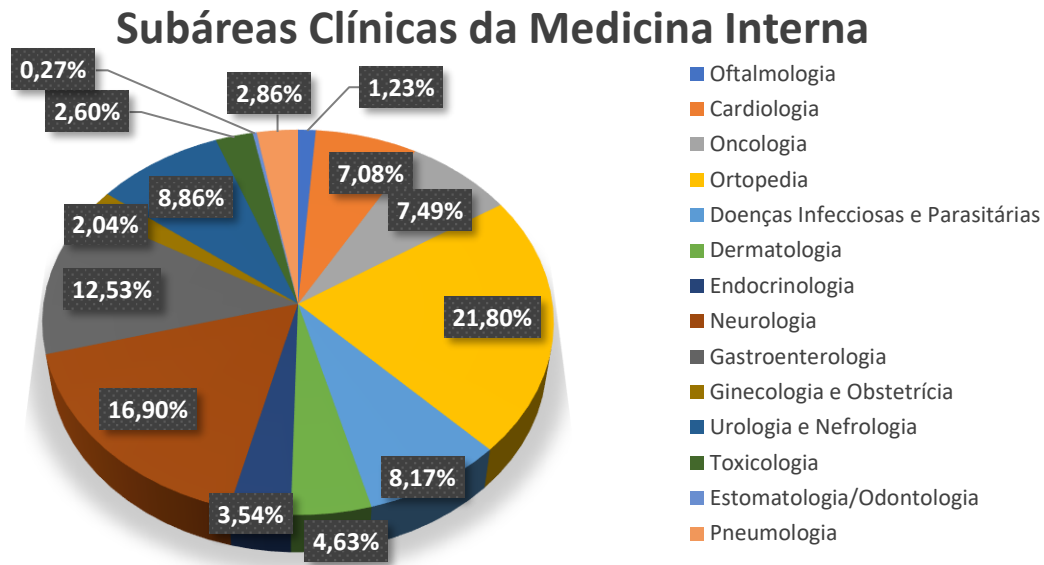


Gráfico 3: Percentagem de casos de medicina interna acompanhados tendo em conta as suas subáreas clínicas.

Tendo em conta a Tabela 3 e o Gráfico 3, facilmente se chega à conclusão de que as subáreas de Ortopedia e Neurologia são as que maior impacto tiveram no decorrer do estágio da autora, pela mesma razão apresentada em cima. Pelo contrário, a subárea de Estomatologia/Odontologia e Oftalmologia foram as que menos representaram o número de casos do estágio.

Na Tabela 4 encontram-se os dados relativos às subdivisões realizadas na área da Cirurgia, que tanto podem ser casos de Tecidos Moles, como de Ortopedia.

Tabela 4: Distribuição do número de casos de cirurgia e anestesia acompanhados tendo em conta as suas subáreas clínicas.

Cirurgia e Anestesia	Cães	Gatos	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Cirurgia de Tecidos Moles	97	44	141	98,60%
Cirurgia Ortopédica	2	0	2	1,40%
Total de casos	99	44	143	100%

Tendo em conta a Tabela 4, o tipo de cirurgias que a autora mais acompanhou foram as de tecidos moles, provavelmente por abranger um maior número de tecidos e pelo facto das ortopédicas serem menos económicas para os tutores, para além de serem realizadas por médicos veterinários ambulatoriais, e não pelos que se encontram na equipa do HVA. Outra razão pode passar pelo facto das de tecidos moles incluírem as ovariohisterectomias e orquiectomias, que não deixam de ser das cirurgias mais frequentes e das mais realizadas como forma preventiva em todos os hospitais/clínicas.

Na Tabela 5 encontram-se os dados relativos à área de Medicina Física e de Reabilitação, que tanto incluem casos do foro Neurológico, como a nível Ortopédico ou Músculo-esquelético.

Tabela 5: Distribuição do número de casos de medicina física e de reabilitação acompanhados tendo em conta as suas subáreas clínicas.

Medicina Física e de Reabilitação	Cães	Gatos	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Neurológico	189	25	214	49,77%
Ortopédico/Músculo-Esquelético	203	13	216	50,23%
Total de casos	392	38	430	100%

Tendo em conta a Tabela 5, dentro da área da Medicina Física e de Reabilitação, o número de casos tanto de Neurologia como de Ortopedia/Músculo-esquelético tornaram-se equivalentes, representando, cada um deles, cerca de 50% dos casos desta área, uma vez que ambas as subáreas são alvo de referência.

II – Revisão Bibliográfica

1. Introdução

1.1. Caracterização E Fisiopatologia Da Osteoartrite

A osteoartrite (OA), ou doença articular degenerativa (Frye, Shmalberg, & Wakshlag, 2016) caracteriza-se por: ser uma condição progressiva com apresentação em qualquer idade (Freitag *et al.*, 2016); destruição e perda da cartilagem articular (Johnson *et al.*, 2012; Falster *et al.*, 2019); alterações no osso subcondral (Vilar *et al.*, 2014), que apresenta esclerose (Ruiz, Cosenza, Maumus, Jorgensen, & Noël, 2015); alterações na membrana sinovial (Vilar *et al.*, 2014), onde se encontra inflamação (Ruiz *et al.*, 2015); alterações dos ligamentos (Vilar *et al.*, 2014) e alterações da cápsula articular, tendões e tecido nervoso (Kilchling, & Meyer-Lindenberg, 2018; Falster *et al.*, 2019) (Figura 1).

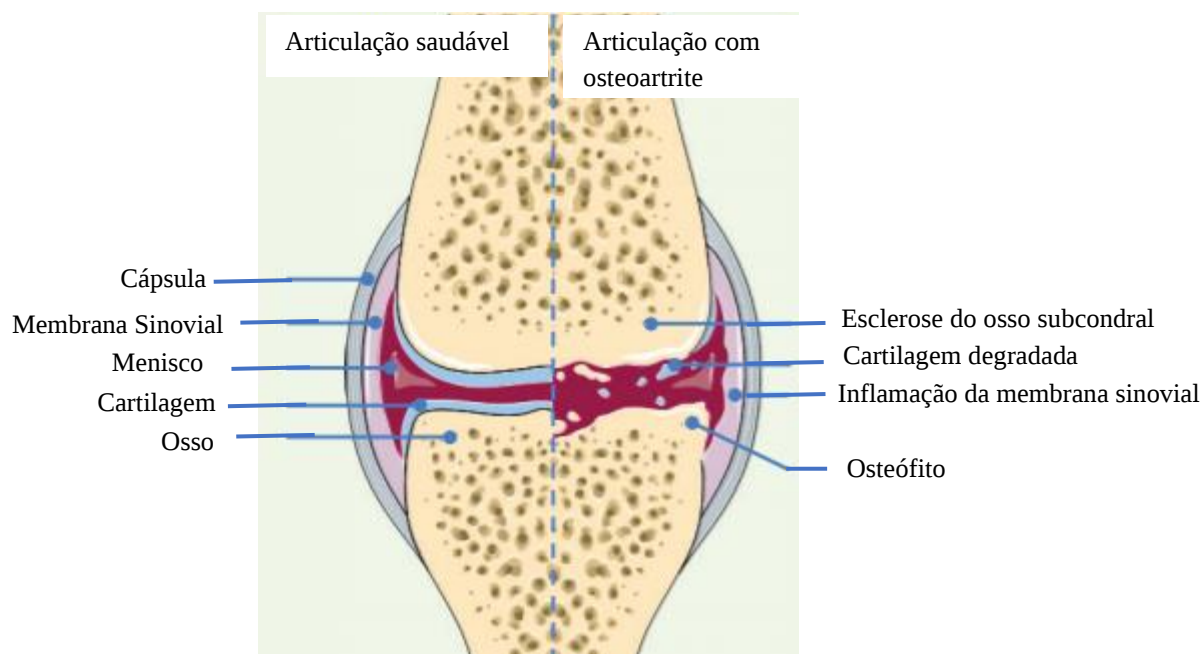


Figura 1: Representação esquemática da doença articular degenerativa (Adaptado de Maumus, Pers, Ruiz, Jorgensen, & Noël, 2018).

A degeneração contínua, associada à fraca capacidade regenerativa, leva ao desenvolvimento da doença (Musumeci *et al.* 2015; Kalamegam, Memic, Budd, Abbas, & Mobasheri, 2018).

Enquanto certos estudos, mesmo em medicina humana, referem que a OA é uma doença articular degenerativa e inflamatória (Maryam, Jianing, & Wilson, 2019), outros direcionados para a medicina veterinária, classificam-na como uma artropatia não inflamatória para a distinguir de artropatias autoimunes ou infecciosas (Frye *et al.*, 2016).

Segundo Johnston, 1997, a OA em cães é, de longe, a forma mais comum de artrite, afetando cerca de 20% da população canina (Guercio *et al.*, 2012). Esta é uma doença que pode ocorrer em todas as raças de cães, embora as grandes sejam afetadas com maior frequência (King, 2017; Zeira *et al.*, 2018). Afeta principalmente as articulações coxofemoral e femuro-tibio-patelar (Ruiz *et al.*, 2015; Diederichs, & Richter, 2017), representando uma das principais causas de incapacidade locomotora e dor crônica (Freitag *et al.*, 2016; Kalamegam *et al.*, 2018).

A patogénese da OA resulta da interação complexa entre o ambiente, o stress mecânico, o episódio de trauma e a genética, resultando na alteração da homeostase (Luyten, 2004; Vinatier & Guicheux, 2016) do tecido cartilaginoso, com desequilíbrio progressivo entre a sua produção e degradação (Frye *et al.*, 2016). Produtos catabólicos e moléculas associadas à lesão acumulam-se na cartilagem, fortalecendo a inflamação, aumentando assim o stress oxidativo (Vinatier & Guicheux, 2016).

A articulação osteoartrítica é caracterizada por uma perda das propriedades viscoelásticas inerentes, apesar das tentativas dos condrócitos de reparação local, e por alterações no osso subcondral, incluindo aumento da formação e renovação óssea (Sharma, Jagga, Lee, & Nam, 2013; Frye *et al.*, 2016).

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo não vascularizado e pouco celularizado que frequentemente é danificado como resultado de trauma e doenças articulares degenerativas, tendo baixa capacidade de reparação espontânea (Vinatier & Guicheux, 2016; Diederichs, & Richter, 2017). Na OA, a degeneração da cartilagem resulta na formação de tecido semelhante à fibrocartilagem e, para compensar essa transformação, os condrócitos aceleram a sua diferenciação, formando um tecido hipertrófico, ou osteófito (Maumus, Pers, Ruiz, Jorgensen, & Noël, 2018).

A nível celular (Mobasheri *et al.* 2017), as alterações patológicas dentro da articulação afetam os condrócitos, que são as células responsáveis pela síntese e reparação da matriz extracelular cartilaginosa (ECM) (Goldring, 2006; Ruiz *et al.*, 2015). A sua inflamação é ativada por células como macrófagos da membrana sinovial e do osso subcondral (Maumus *et al.*, 2018) e a sua incapacidade de tolerar tensão exercida impede a manutenção da homeostase e, portanto, a formação dessa matriz (Fotouhi, Maleki, Dolati, Aghebati-Maleki, & Aghebati-Maleki, 2018).

A ativação dos condrócitos resulta na secreção de citocinas, como interleucina -1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), mediadores lipídicos incluindo prostaglandina E2 (PGE2) e espécies reativas de oxigénio e nitrogénio como o óxido nítrico (Maumus *et al.*, 2018). Estas alterações resultam na diminuição da viabilidade dos condrócitos e induzem um desequilíbrio entre a atividade anabólica e catabólica (inflamatória) (Park *et al.*, 2019) a favor da síntese de vários marcadores do processo degradativo da matriz (Sutton *et al.*, 2009; Frye *et al.*, 2016) e da cartilagem (Burrage, 2006; Ruiz *et al.*, 2015; Fotouhi *et al.*, 2018).

A lesão da cartilagem e os processos catabólicos associados são irreversíveis e levam ao desenvolvimento de OA a longo prazo (Vinatier & Guicheux, 2016), podendo causar atrito entre os ossos e causar dor e imobilidade nos animais (Mehranfar, Abdi, Mostafav, & Akbarzadeh, 2019).

Os estudos da biologia da cartilagem forneceram conhecimento sobre a apoptose dos condrócitos como um elemento-chave na degeneração da cartilagem na OA (Hashimoto, Ochs, Komiya, & Lotz, 1998). Estudos indicam que a doença já não é considerada um acontecimento natural de desgaste do corpo, mas sim um distúrbio provocado por inflamação crónica de baixo grau (Robinson, 2016; Park *et al.*, 2019), associada à ativação do metabolismo dos condrócitos (Maumus *et al.*, 2018). A inflamação sistémica de baixo grau, como um dos fatores de risco da OA, é criada quando a massa muscular diminuiu e a massa gorda do corpo aumenta. Esta condição metabólica, como observada na obesidade, pode alterar a carga mecânica (Mehranfar *et al.*, 2019).

Um dos fatores que mais impacto tem no desenvolvimento da OA, tanto em medicina humana, como na veterinária, é a idade (Fotouhi *et al.*, 2018), quer pela diminuição do número de condrócitos, quer pelas mudanças estruturais nas componentes da ECM, incluindo o colagénio tipo II e os proteoglicanos, levando a uma provável alteração nas propriedades biomecânicas dessa matriz (Freitag *et al.*, 2016).

1.2. Etiologia Da Osteoartrite

A OA é uma doença crónica multifatorial (Vilar *et al.*, 2014; Fotouhi *et al.*, 2018) e, embora a idade seja o principal fator de risco para o seu desenvolvimento, a doença pode não ser simplesmente o resultado do uso da articulação ao longo da vida (Intema *et al.*, 2008).

A condição é normalmente dividida em primária e secundária. A primária foi descrita como resultado de tensões de cargas repetitivas, envelhecimento e predisposição genética. As

causas secundárias incluem doença ortopédica do desenvolvimento, lesão traumática, carga articular anormal como no caso de deformidade de membro ou luxação patelar medial, rutura do ligamento cruzado cranial (CCL), deformidades anatómicas na articulação (Sandell, 2012), obesidade ou infeção (Wojdasiewicz et al., 2014; Frye *et al.*, 2016; Fotouhi *et al.*, 2018).

No cão, além do acima mencionado, outros fatores de risco incluem questões individuais como sexo, raça e regime alimentar (Plotnikoff *et al.*, 2015; Maumus *et al.*, 2018). Por outro lado, destacam-se fatores relacionados com a articulação como atividade física, estilo de vida e força muscular (Chaganti & Lane, 2011; Plotnikoff *et al.*, 2015; Fotouhi *et al.*, 2018), sendo as articulações de suporte de peso e as que sofrem stress repetitivo e desgaste excessivo as mais propensas ao seu desenvolvimento (Kalamegam *et al.*, 2018).

1.3. Sinais Clínicos E Diagnóstico Da Osteoartrite

A OA causa sinais clínicos em mais de 20% dos cães com mais de um ano de idade e em 80% dos geriátricos (Tellegen *et al.*, 2019). Clinicamente, muitos deles apresentam sintomas sugestivos de inflamação articular, como rigidez (Frost-Christensen *et al.*, 2008), crepitação e aumento da temperatura local, assim como edema articular (Intema *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2019). Estudos indicam que a dor é o principal problema da OA, além de também ser comum o animal apresentar claudicação (Renberg 2005). Embora menos comum, o animal também pode apresentar bloqueio articular, prostração, desconforto, distúrbios do sono e ansiedade (Cuervo *et al.*, 2014; Nganvongpanit, Buddhachat, & Brown, 2015). É uma doença que leva a incapacidade funcional (Frost-Christensen *et al.*, 2008), podendo causar uma diminuição da qualidade de vida e aumento da mortalidade (Felson, 2000; Fotouhi *et al.*, 2018).

Embora a OA se desenvolva ao longo de vários anos, a ausência de inervação dentro da cartilagem está associada ao início tardio dos sinais clínicos que normalmente são inespecíficos (Intema *et al.*, 2008), o que associado à ausência de alterações laboratoriais precisas (Mehranfar *et al.*, 2019), faz com que o diagnóstico não possa ser realizado até que características degenerativas avançadas causem alterações radiográficas, levando a um diagnóstico tardio e, consequentemente, um tratamento tardio (Intema *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2015).

Antes de envergar para a realização de exames complementares de diagnóstico, é importante fazer um exame físico direcionado à(s) articulação(ões) e a todo(s) o(s) membro(s) em causa. Nesse exame será de incluir a observação de edema, crepitação e temperatura aumentada da articulação; a palpação dos músculos, procurando ausência ou presença de atrofia

muscular; assim como observação de assimetria contralateral e do tónus muscular (Egger, Love, & Doherty, 2014).

Apesar das características radiográficas da OA serem inespecíficas, as radiografias básicas continuam a ser o padrão ouro para o diagnóstico, avaliação e monitorização da doença articular. As alterações radiográficas na OA grave incluem evidências de sinais compatíveis com derrame articular, osteofitose e entesofitose, mineralização intra-articular, esclerose e remodelação anormal do osso subcondral (Blum et al. 2015), formação de quisto subcondral e estreitamento do espaço articular (Fotouhi *et al.*, 2018). Para quantificar as alterações observadas nas radiografias, sistemas de classificação foram desenvolvidos para osteoartrite grave em cães (Anexo 1, Figura 25) (Fotouhi *et al.*, 2018).

Segundo Kealy *et al.*, 2000, especificamente para as articulações femuro-tibio-patelar, com o auxílio da radiografia latero-lateral, o grau de OA foi avaliado subjetivamente com base na gravidade da osteofitose na patela, tróclea femoral, *plateau* tibial e ossos sesamóides do músculo gastrocnémio; presença ou ausência de uma almofada de gordura infrapatelar normal ou anormal e presença ou ausência de deslocamento dos ossos sesamóides lateral e medial do músculo gastrocnémio e do músculo poplíteo. Dentro de cada articulação, cada categoria de OA foi subjetivamente pontuada nas radiografias da seguinte forma: livre de doença - 0; OA leve - 1; OA moderado - 2; e OA grave - 3. Pontuações crescentes em cada categoria representaram aumentos progressivos na formação de osteófitos, esclerose subcondral e remodelação articular (Kealy *et al.*, 2000). No entanto, o sistema mais comum para medir a gravidade da OA radiográfica é o grau de Kellgren e Lawrence (K&L), que usa uma escala de cinco pontos entre 0 e 4, com graus iguais ou superiores a 2 indicando OA radiográfica, como indicado no Anexo 1, Tabela 12.

Enquanto isso, a imagem por ressonância magnética (MRI) e a tomografia computadorizada com múltiplos detetores (MDCT) são utilizadas em caso de incerteza diagnóstica e tornaram-se necessárias para a classificação da doença (Altman & Gold, 2007; Raynauld *et al.*, 2011).

A reabilitação física pode influenciar o retorno do movimento articular, portanto, a sua medição torna-se imprescindível (Millis & Levine, 2014). A estabilidade de uma articulação deve ser determinada por meio da medição da amplitude de movimento articular (ROM do inglês '*Range of Motion*') – através de um goniómetro manual – e será importante incluir a observação de dor à extensão e à flexão da articulação (Egger *et al.*, 2014). A forma para

realização adequada desta avaliação será discriminada adiante, no capítulo de materiais e métodos.

Este trabalho cinge-se às articulações femuro-tibio-patelar (joelho) e coxofemoral (anca), cujos valores considerados normais de flexão e extensão se encontram mencionados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de amplitude de movimento articular normais das articulações coxofemoral e femuro-tibio-patelar (Adaptado de Millis & Levine, 2014).

Articulação	Movimento Articular	Amplitude do Movimento Articular normal (Cães) em graus
Coxofemoral	Flexão	55
	Extensão	160-165
Femuro-tibio-patelar	Flexão	45
	Extensão	160-170

Outra medição importante na avaliação da evolução da OA é a da massa muscular, sendo o grau de atrofia muscular também uma indicação razoável da capacidade de apoio. A forma para realização adequada desta avaliação será também discriminada adiante, no capítulo de materiais e métodos.

1.4. Fenómeno Da Dor

A dor é definida como experiência sensorial e emocional desagradável desencadeada por estímulos intensos ou prejudiciais (Klaumann, Wouk, & Sillas, 2008; Gaynor & Muir, 2015). Para isso, a resposta à dor envolve duas componentes: a sensorial (nociceção) e a afetiva, que é a percepção da dor (Epstein *et al.*, 2015).

O componente fisiológico da dor é chamado nociceção (Klaumann *et al.*, 2008) e desempenha um papel adaptativo integral como parte da defesa normal do corpo, alertando para a existência de estímulos prejudiciais (Lamont, Tranquilli, & Grimm, 2000; Sneddon, Elwood, Adamo, & Leach, 2014).

A geração de dor em resposta à lesão do tecido envolve os processos de projeção, transdução, transmissão, modulação e percepção de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo (Lamont *et al.*, 2000; Klaumann *et al.*, 2008; Moore, 2016) (Figura 2).

A projeção conta com a atividade do segundo neurónio da medula espinhal enviando a informação para o tálamo, através do eixo espinotalâmico. A transdução envolve a conversão de um estímulo nocivo em um sinal nocicetivo ao nível do nociceptor (Moore, 2016), envolvendo o neurónio primário; a transmissão representa a propagação dos sinais nocicetivos ao longo das fibras nervosas do local da lesão original para o sistema nervoso central (SNC), através de fibras C e fibras A δ (Hernandez-Avalos *et al.*, 2019); a modulação é o mecanismo pelo qual os sinais nocicetivos são alterados no SNC; e finalmente, a percepção consiste no processamento da informação (Hernandez-Avalos *et al.*, 2019), envolvendo a integração de respostas cognitivas e emocionais ao estímulo nocivo (Gaynor & Muir, 2015; Goldberg & Shaffran, 2015; Moore, 2016; Bell, 2018), contando com o terceiro neurónio para a informação passar o tálamo e chegar até ao córtex somatosensorial.

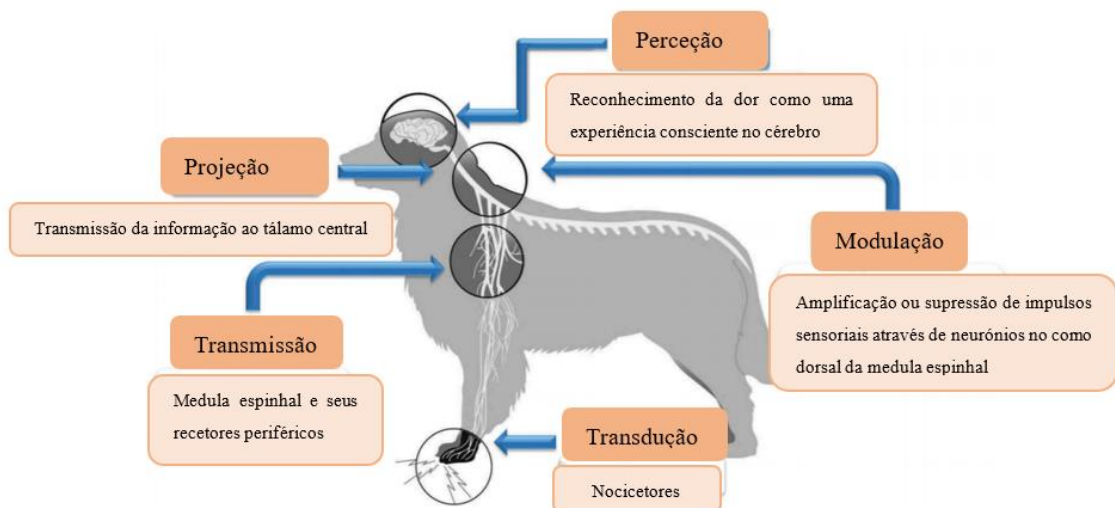


Figura 2: Diagrama da via da dor (adaptado de Hernandez-Avalos *et al.*, 2019).

Os neurónios de primeira ordem são os aferentes primários, sendo os responsáveis pelas deteção e codificação da modalidade e intensidade do estímulo (Gaynor & Muir, 2015). Estes são classificados em três grandes grupos: fibras A β que são fibras de grande diâmetro (maior que 10 micrómetros (μm)), mielinizadas e de condução rápida, responsáveis por sensações inócuas (Klaumann *et al.*, 2008). Geralmente respondem a estímulos mecânicos (táteis, físicos) de baixa intensidade (toque, pressão) e mostram adaptação rápida (Gaynor & Muir, 2015). Outro grupo são as fibras A δ , sendo estas de diâmetro intermediário (2 a 6 μm), mielinizadas e de velocidade de condução intermédia, modulando a primeira fase da dor, durando apenas ao longo da ativação do estímulo doloroso (Lamont *et al.*, 2000; Klaumann *et al.*, 2008). São sensíveis a estímulos mecânicos intensos (mecanorreceptores de alto limiar)

(Klaumann *et al.*, 2008). Por último, as fibras C, que são de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μm), não mielinizadas e de velocidade de condução lenta, responsáveis por uma segunda fase de dor – mais difusa e persistente (Klaumann *et al.*, 2008), que se estende além do término de um estímulo doloroso agudo (Lamont *et al.*, 2000). Formam, na periferia, recetores de alto limiar para estímulos térmicos e/ou mecânicos (Klaumann *et al.*, 2008).

1.4.1. Tipos de Dor

A dor fisiológica é aquela que induz as respostas protetoras, como o reflexo de retirada (ou reação de fuga), com intuito de interromper a exposição ao estímulo nocivo (Klaumann *et al.*, 2008). A dor inflamatória ocorre em resposta à lesão do tecido e à resposta inflamatória subsequente (Costigan, Scholz, & Woolf, 2009).

A dor também pode ser definida segundo a determinação temporal em dor aguda ou crónica. A dor aguda tipicamente surge do trauma de tecidos moles ou inflamação e está relacionada com um processo adaptativo biológico para facilitar a reparação do tecido e a cicatrização (Lamont *et al.*, 2000; Klaumann *et al.*, 2008), desaparecendo assim que o tecido danificado é tratado (Landa, 2012). A dor crónica persiste além do período esperado de uma doença ou lesão (Klaumann *et al.*, 2008; Landa, 2012) e tem sido arbitrariamente definida como aquela que é superior a 3 a 6 meses (Goldberg & Shaffran, 2015).

A dor crónica pode ser subdividida segundo a sua origem em nociceptiva e neuropática (Klaumann *et al.*, 2008). A dor nociceptiva é um alarme mediado por fibras C e fibras A δ que se alimentam das vias nociceptivas do SNC (Woolf & Ma 2007) e ocorre quando os recetores neurais periféricos são ativados por estímulos nocivos (Epstein *et al.*, 2015). No caso da OA, esta gere estímulos nocivos recorrentes ou contínuos para produzir dor nociceptiva crónica (Costigan *et al.*, 2009). A dor neuropática origina-se devido a lesões de nervos periféricos ou do SNC (Lamont *et al.*, 2000) e surge como um distúrbio do processamento da atividade nociceptiva ou como resultado de uma atividade anormal nas vias nociceptivas (Lamont *et al.*, 2000).

Embora, tradicionalmente, a dor tenha sido categorizada como aguda ou crónica com base na duração, uma abordagem mais contemporânea considera a dor como adaptativa ou desadaptativa (Woolf, 2004). A dor adaptativa é uma resposta normal a lesões nos tecidos, sendo que este tipo de dor inclui dor inflamatória que resulta gradualmente da ativação do sistema imunológico em resposta à lesão ou infeção (Hellyer *et al.*, 2007; Epstein *et al.*, 2015). A perda de nociceção leva a lesões repetidas e auto-mutilação inadvertida, ilustrando a função altamente adaptativa da dor nociceptiva (Costigan *et al.*, 2009). Se a dor adaptativa não for

gerenciada de forma adequada, mudanças físicas ocorrem na medula espinhal e no cérebro, levando a uma dor mal-adaptativa, como o caso da dor neuropática (Hellyer *et al.*, 2007), no sentido em que a dor não protege nem apoia a cura e a reparação (Costigan *et al.*, 2009).

1.4.2. Avaliação clínica da dor

A dor é uma sensação subjetiva e, portanto, deve ser avaliada pelo indivíduo afetado. Infelizmente, os cães não podem fornecer diretamente essas informações e, portanto, outros métodos devem ser utilizados, embora atualmente não exista um padrão específico para medir a dor crónica em cães (Hjelm-Bjorkman *et al.*, 2003).

A nível comportamental deve estar-se atento a alterações como o nível da atividade (Epstein *et al.*, 2015), o grau de claudicação, a presença de vocalização e a reação à manipulação (Egger *et al.*, 2014; Vilar *et al.*, 2016). Vários tipos de escalas baseadas em sinais comportamentais (Vilar *et al.*, 2016) têm sido usadas para avaliar a dor em cães (escalas apresentadas no Anexo 2).

O grau de claudicação pode ser avaliado subjetivamente usando um sistema de pontuação, permitindo a sua comparação ao longo do tempo (Millis & Levine, 2014) (Anexo 3, Figuras 32 e 33).

Além do descrito, existem várias escalas que tornam mais precisa a identificação e avaliação da evolução da dor. De entre essas escalas, pode dividir-se em escalas subjetivas/unidimensionais e escalas objetivas/multidimensionais. As primeiras incluem: Escala Descritiva Simples (SDS); Escala de Classificação Numérica (NRS) e Escala Visual Analógica (VAS) (Anexo 2, Figura 26). As escalas objetivas incluem escalas de dor aguda e crónica. Nas agudas destacam-se: Escala de Dor da Universidade de Melbourne (Anexo 2, Figura 27); Escala Composta de Medição da Dor de Glasgow (Anexo 2, Figura 28) e Escala de Dor da Universidade de Colorado (Anexo 2, Figura 29). Já nas escalas direcionadas para a dor crónica destacam-se: Escala de Dor da Universidade de Colorado (Anexo 2, Figura 30); Índice de Dor em Cães (Anexo 2, Figura 31); Índice de Dor Crónica Helsinki; Índice de Incapacidade Ortopédica de Cincinnati e Instrumento de Osteoartrite em Cães de Liverpool.

No Anexo 4 encontram-se as diversas escalas existentes na tentativa de classificação da dor, incluídas em tabelas comparativas entre as diversas escalas (Tabelas 13, 14 e 15).

1.5. Tratamento Da Osteoartrite

A restauração da cartilagem articular em doentes com OA ainda é um desafio (Vilar *et al.*, 2014), sendo por isso imperativo desenvolver abordagens terapêuticas que possam regenerar os tecidos hialinos integrados para uma melhor reabilitação articular (Hunziker 1999; Gugjoo *et al.* 2016; Juneau *et al.* 2016). As abordagens terapêuticas atuais na medicina veterinária são limitadas (Intema *et al.*, 2008) e visam prevenir ou, pelo menos, retardar as mudanças estruturais e funcionais da OA, tendo como objetivos a redução dos sinais clínicos (Cuervo *et al.*, 2014; Freitag *et al.*, 2016), a manutenção das capacidades funcionais, como a flexibilidade articular (Lee, Kim, Kim, Kim, & Jin, 2019), e a melhoria da qualidade de vida (Mehranfar *et al.*, 2019), atrasando a progressão da doença (Lee *et al.*, 2019), em vez de procurar curá-la (Intema *et al.*, 2008).

Tendo em conta o descrito anteriormente acerca da OA, tanto na medicina humana, como na medicina veterinária, os doentes beneficiam de um tratamento multimodal (Gibbs, Diamond, Sekyere, & Thomas, 2015; Fotouhi *et al.*, 2018). Os métodos mais comuns para controlar os sinais clínicos relacionados à OA incluem manejo não farmacológico, manejo farmacológico – convencional e biológico – e, caso necessário, abordagem cirúrgica (Kalamegam *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019).

1.5.1. Maneio Não Farmacológico

Neste tipo de manejo inclui-se suplementação nutricional, controlo de peso (Messier *et al.*, 2004; Fotouhi *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019) e fisioterapia. Nesta última destacam-se exercícios moderados (Kalamegam *et al.*, 2018), como atividades de fortalecimento, aeróbicas e de flexibilidade muscular e articular no tapete rolante terrestre/aquático (Murphy, Eyles, & Hunter, 2016), massagens terapêuticas (Christensen *et al.* 2005; Ernst e Posadzki 2011), laserterapia classe IV e ondas-choque, sendo estas duas últimas desenvolvidas adiante, uma vez terem sido um complemento da terapêutica dos casos de OA estudados na presente dissertação.

1.5.2. Maneio Farmacológico

1.5.2.1. Maneio Farmacológico Convencional

No manejo farmacológico convencional, os agentes comumente prescritos no tratamento da OA incluem anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (Fenge *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019), opióides analgésicos e ácido hialurónico (Kalamegam *et al.*, 2018).

Os AINEs são usados em casos leves a moderados de OA e parecem ser eficazes, pois além dos efeitos anti-inflamatórios, possuem propriedades analgésicas. No entanto, o

tratamento prolongado com AINEs pode causar gastrite e hemorragia gastrointestinal (Kalamegam *et al.*, 2018), comprometimento renal (Lee *et al.*, 2019), afeção da atividade plaquetária (Lee *et al.*, 2019) e, em certos casos, insuficiência hepática aguda. Na OA grave, o cão pode-se tornar refratário aos AINEs (Sullivan, Gordon-Evans, Knap, & Evans, 2013).

Relativamente aos opióides analgésicos, um dos exemplos utilizados é o tramadol que é um opioide não narcótico fraco, que pode ser considerado para o alívio da dor (Murphy *et al.*, 2016), sendo estes agentes usados na OA moderada a grave. No entanto, inicialmente estudado em humanos, os efeitos colaterais associados, como náuseas, vômitos e sonolência limitam o seu uso (DeLemos *et al.* 2011).

Como alternativa, em casos mais graves será possível recorrer a injeções intra-articulares de ácido hialurónico (HA) (Lee *et al.*, 2019). Este fármaco é um glicosaminoglicano natural (Mehranfar *et al.*, 2019) que tem ganhado popularidade em vários países como o tratamento sintomático de primeira linha em certos casos de OA moderada a grave, no entanto, têm aceitação e eficácia variáveis. Outros estudos referem a sua utilização em casos de OA leve a moderada (Freitag *et al.*, 2016). Esta abordagem de tratamento é baseada nas propriedades analgésica, anti-inflamatória (Murphy *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019) e antinocicetiva do HA, aumentando as propriedades lubrificantes semelhantes às do líquido sinovial nas articulações (Lee *et al.*, 2019). Além disso, pode induzir diretamente a síntese de HA endógeno (Lee *et al.*, 2019), que é encontrado no fluido da região sinovial, desempenhando um papel na sustentação da hidratação tecidual e homeostase de proteínas.

1.5.2.2. Maneio Farmacológico Biológico

A falta de benefício sustentado com agentes farmacológicos convencionais levou ao desenvolvimento de agentes biológicos que podem limitar a progressão da doença de OA a nível molecular, encontrando-se amplamente conhecidos para estimular condrogénese, inibir a apoptose, inibir a degradação da matriz e reduzir a inflamação, sendo o plasma rico em plaquetas (PRP) e as células estaminais uns dos que têm sido mais comumente investigados.

Investigações recentes na medicina veterinária têm mostrado que os fatores de crescimento contidos no PRP atuam como veículos que podem atuar como potencializadores ou mesmo estender o efeito de outras terapias regenerativas, o que pode ser explicado pelo seu efeito anti-inflamatório (Maldonado & Nam, 2013; Vilar *et al.*, 2014).

Mais recentemente, sobretudo em medicina humana, têm surgido estudos que revelam o benefício da utilização de células estaminais em casos de OA (Freitag *et al.*, 2016). Uma vez que este é o tema principal da dissertação, o mesmo terá um maior destaque em capítulo próprio.

1.5.3. Abordagem Cirúrgica

Principalmente na medicina humana, quando o tratamento com métodos farmacológicos e não farmacológicos se torna insuficiente, a intervenção cirúrgica é indicada na OA grave com perda de cartilagem de espessura total para promover a reparação da cartilagem por implantação de estruturas articulares artificiais (artroplastia) (Kalamegam *et al.*, 2018) ou substituição total da articulação (TJR). Essas cirurgias de realinhamento ou de substituição articular são comuns em doentes com OA em estadio terminal e são as mais comumente utilizadas (Kalamegam *et al.*, 2018).

Embora intervenções cirúrgicas, como artroplastia total do joelho, possam superar parcialmente a dor e a deformidade em doentes com OA em estadio final, isso também pode causar complicações adicionais (Freitag *et al.*, 2016), como aumento do risco de infeção, formação de trombo (Ruiz *et al.*, 2015) e cirurgia secundária, particularmente em animais geriátricos (Wang *et al.*, 2017). Outro tipo de limitação é o facto de ser apenas possível realizar esta terapia em lesões focais e podem não ser adequadas no campo da OA, onde o volume de perda de cartilagem é mais generalizado (Mehranfar *et al.*, 2019).

A adequação das diferentes técnicas é determinada conforme a localização e o estadio da OA, comorbilidades e desconforto do animal.

1.6. Modalidades Da Reabilitação Funcional Com Papel Na Medicina Regenerativa

1.6.1. Laserterapia Classe IV

A laserterapia é outra modalidade terapêutica que tem sido envolvida no tratamento da OA e que, muitas vezes em conjunto com outras terapias, procura controlar a dor. Associada à terapia regenerativa, segundo Pryor & Millis, 2015, foi apenas há menos de 10 anos que o uso desta modalidade se tornou mais difundido. Na última década, tanto a terapia a laser de baixo nível como a terapia a laser de alto nível têm sido utilizadas para tratar a dor associada à OA humana sem efeitos adversos (Huang *et al.*, 2015; Youssef, Muaidi, & Shanb, 2016; Barale, Monticelli, Raviola, & Adami, 2020).

O termo laser é um acrónimo para ‘*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*’ (Millis, Francis, & Adamson, 2005; Eslamian, Shakouri, Ghojzadeh, Nobari, &

Eftekharsadat, 2011), sendo esta uma forma de radiação eletromagnética que utiliza fontes de laser (Formenton *et al.*, 2017).

Os primeiros lasers utilizados para fins de reabilitação designada terapia laser de baixo nível eram lasers de baixa potência (lasers frios) – 500 mW ou menos (Baxter & McDonough, 2007). Pelo contrário, os lasers cirúrgicos são de alta potência e com capacidade de destruição celular e tecidual, termicamente. Recentemente, um outro tipo de laser, com maior potência do que os de baixo nível, mas de menor potência do que os cirúrgicos, e referido como laser terapêutico, passou a ser utilizado na reabilitação (Haslerud, Magnussen, Joensen, Lopes-Martins, & Bjordal, 2014).

A terapia a laser de alto nível foi introduzida apenas em 2011 e uma revisão sistemática recente que incluiu os primeiros 6 estudos realizados em pessoas descobriu que esta era eficaz na redução da dor e na melhoria funcional em casos de OA de joelho em humanos (Wyszyńska & Bal-Bocheńska, 2018).

Várias classes de laser são usadas como terapia, consoante o seu potencial pode causar lesões à pele e olhos do operador, sendo as classes 3B e 4 as mais comumente utilizadas em reabilitação (Haslerud *et al.*, 2014). Para além disso, os lasers podem ainda ser classificados como laser de forma contínua ou pulsada. Na forma contínua, os fotões são emitidos a uma potência constante ao longo do tempo de tratamento, enquanto que na forma pulsada, a emissão de fotões é descontínua, com taxas variáveis de repetição e duração dos pulsos (Sousa, 2017).

Estudos indicam que comprimentos de onda mais altos (780–950 nanómetros (nm)) são melhores para tecidos mais profundos, enquanto comprimentos de onda de 600–700nm são os melhores para o tratamento de tecidos superficiais (Chung *et al.*, 2012; Looney, Huntingford, Blaeser, & Mann, 2018).

Apesar do descrito e das variações da laserterapia em cima mencionadas, há que ter em consideração que, em ambiente clínico, muitos fatores como pelagem, cor do pelo e da pele, assim como a profundidade do local a ser tratado podem reduzir a energia do laser fornecida aos tecidos-alvo (Barger, Bisges, Fox, & Torres, 2020).

As células estaminais e as células progenitoras parecem ser particularmente suscetíveis à laserterapia (Looney *et al.*, 2018) e isso é algo que se traduz em uma variedade de efeitos da irradiação a laser, tendo sido relatadas alterações da condução nervosa, circulação sanguínea e estimulação da angiogénese (Formenton *et al.*, 2017). É ainda de acrescentar que a laserterapia

auxilia na cicatrização de lesões ao nível dos tecidos moles (Hawkins & Abrahamse, 2006; Poorpezhshk, Ghoreishi, Bayat, Pouriran, & Yavari, 2018) e é amplamente utilizada para redução da dor e da inflamação (Baxter & McDonough, 2007; Moser-Kats & Veenman, 2008; Gross, 2014). Este tipo de terapia está indicada no acompanhamento dos diferentes tipos de feridas e úlceras (Formenton *et al.*, 2017); em neuropatias (Akyuz & Kenis, 2014); em lesões agudas/trauma, ao nível de tendões e ruturas musculares, hematoma, entorse de ligamentos, fraturas e subluxações; condições musculoesqueléticas como lesões por esforço repetitivo, fibromialgia e doenças da articulação temporomandibular e condições inflamatórias agudas e crónicas como tendinite, bursite, miosite, fascite e sinovite, artrite e a doença do nosso estudo, OA (Baxter & McDonough, 2007; Pryor & Millis, 2015; Formenton *et al.*, 2017).

Especificamente para a OA, visto ser esta a doença em estudo nesta dissertação, em relação à literatura veterinária ainda poucos estudos estão descritos e, segundo Looney *et al.*, 2018, apenas um estudo realizado com 20 cães com OA de cotovelo relatou o sucesso da utilização da modalidade para tratar a dor crónica associada à OA canina.

É de referir que o tratamento de uma articulação osteoartrítica requer a penetração do laser através da pele e dos tecidos subcutâneos para atingir a cápsula articular, o líquido sinovial e a cartilagem, onde se acredita que a energia do laser tenha o maior efeito (Barger *et al.*, 2020).

Através de estudos como o de Barale *et al.*, 2020, não será errado dizer que este tipo de terapia se demonstra eficaz para redução da dosagem de terapêutica analgésica sistémica, para além de contribuir para uma melhor qualidade de vida do animal.

Embora nenhum efeito colateral da laserterapia tenha sido observado nos doentes da maior parte dos estudos (Barale *et al.*, 2020), as contraindicações desta modalidade incluem epifisite, melanomas, hemorragia exuberante e lesões ao nível dos olhos e testículos (Gross, 2014).

1.6.2. Ondas-choque

À semelhança da laserterapia, também a utilização das ondas-choque é outra medida para controlo de dor em casos de OA, beneficiando também esta da associação com a medicina regenerativa, através da utilização de células estaminais descrito adiante. A terapia com ondas choque extracorpóreas (Bonnechère & Van Sint Jan, 2019) é aplicada transcutaneamente e utiliza ondas acústicas de alta intensidade com rápido aumento da pressão de pulso para estimular a cicatrização do tecido (Kirkby & Lewis, 2011; Henderson *et al.*, 2015). Além disso,

permite aumentar a expressão de citocinas e fatores de crescimento nos tecidos e reduzir a dor associada à inflamação crónica (Kirkby & Lewis, 2011).

Dois tipos diferentes de ondas de choque podem ser usados para o tratamento de distúrbios ortopédicos - ondas de choque focadas e radiais. As focadas têm a capacidade de concentrar a energia em diferentes profundidades de tecido e atingem a sua maior densidade de energia nas profundezas do tecido, enquanto que as ondas de choque radiais diminuem em energia, são entregues à superfície do corpo e, a partir daí, dispersam rapidamente pelos tecidos (Mueller, Bockstahler, Skalicky, Mlacnik, & Lorinson, 2007; Gaynor & Muir, 2015). Independentemente do tipo utilizado, o animal beneficia de estar sedado, procurando um maior conforto animal. Além disso, o tratamento torna-se mais eficaz caso seja realizada tricotomia do local, assim como se for utilizado um gel que permite um melhor contacto entre a pele do animal e a sonda das ondas-choque (Millis & Levine, 2014).

Embora o tratamento de animais com esta terapia seja relativamente recente, já vários estudos foram realizados em medicina veterinária para esclarecer o seu efeito em questões dermatológicas, tendinosas, neurovasculares, ósseas e cartilagíneas (Delius, Draenert, Al Diek, & Draenert, 1995; Haupt, 1997; Schaden, Fischer, & Sailer, 2001; Wang *et al.*, 2003), tendo estes sido satisfatórios, pelo que pode estar envolvida no tratamento de doenças como tendinites, desmites, fraturas e OA (Ogden, Alvarez, Levitt, & Marlow, 2001; Laverty & McClure, 2002; Danova & Muir, 2003; Venzin, Ohlerth, Koch, & Spreng, 2004).

A terapia por ondas choque tem efeitos condroprotetores benéficos, como diminuição da metaloproteinase e aumento da síntese de colagénio tipo II, anabolismo e aumento do fluxo sanguíneo para o osso subcondral (Souza, Ferreira, Hagen, Patrício, & Matera, 2016). Assim sendo, os principais efeitos clínicos conseguidos após tratamento com ondas de choque incluem redução da inflamação e inchaço, efeitos de analgesia a curto prazo, melhoria da vascularização e cicatrização de ossos e tecidos moles (Ogden *et al.*, 2001; Thiel, 2001; Wang *et al.*, 2003), tendo ainda propriedades antibacterianas (Sems, Dimeff, & Iannotti, 2006), o que será de extrema utilidade nos nossos casos de OA. Especificamente nesta doença, a terapia por ondas choque não parece retardar a sua progressão, mas diminuir a dor, tendo isto sido demonstrado com cães com OA na articulação coxofemoral que apresentaram menor grau de claudicação após os tratamentos, mas onde a doença progrediu radiograficamente (Dahlberg, Fitch, Evans, McClure, & Conzemius, 2005).

Apesar dos benefícios potenciais, os animais que sofrem de distúrbios de coagulação não devem ser tratados com este tipo de modalidade. Sabe-se que a intensidade da energia diminui em proporção ao quadrado da distância da fonte na terapia por ondas de choque radial; portanto, doses eficazes podem levar ao aumento da incidência de efeitos adversos menores. Ainda assim, até hoje não foram detetados efeitos adversos evidentes com este tipo de terapêutica (Souza *et al.*, 2016).

1.6.3. Células Estaminais

Terapia de medicina regenerativa, como definido pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, é o processo de criação de tecidos vivos e funcionais para reparar, substituir e regenerar tecidos ou órgãos danificados por meio do uso de células manipuladas *ex vivo* (Guercio *et al.*, 2012; Sherwood, Roush, Armbrust, & Renberg, 2017). Para tal, vários tipos de células podem ser utilizados para permitir a recuperação tanto estrutural quanto funcional (Kalamegam *et al.*, 2018).

As terapias usando células estaminais são praticadas há quase três décadas (Kalamegam *et al.*, 2018), sendo que na maioria dos casos humanos, a sua utilização ainda é considerada experimental. Na medicina veterinária, embora a literatura seja mais limitada (Gugjoo, Fazili, Gayas, Ahmad, & Dhama, 2019) do que na humana, desde o início dos anos 2000 que a terapia celular é uma realidade clínica (Markoski, 2016), tendo sido usada pela primeira vez por Herthel para tratar desmíte do ligamento suspensor (Fortier & Travis, 2011), seguindo para o tratamento de lesões tendíneas em equinos, sendo que atualmente tem sido considerada para a restauração da homeostase e reparação articular (Luyten, 2004; Markoski, 2016).

Célula estaminal refere-se a qualquer célula não especializada capaz de se autorrenovar a longo prazo por meio da divisão celular, diferenciando-se em uma célula funcional especializada (Quimby, 2018), sendo que quase todos os tecidos animais podem ser reparados ou regenerados pela ação direta destas células (Markoski, 2016). As suas principais características incluem então (Kolios, & Moodley, 2013): autorrenovação, que se refere a uma extensa capacidade de proliferação; clonalidade, geralmente decorrente de uma só célula e potência, sendo a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células.

Durante toda a vida de um indivíduo, vários tipos de células estaminais estão disponíveis com diferentes potenciais de diferenciação, sendo que há tendência para que nos estádios iniciais de desenvolvimento, as células estaminais carreguem um potencial de

diferenciação mais amplo, diminuindo ao longo do desenvolvimento (Gugjoo, Amarpal, & Sharma, 2019). Sendo assim, quanto mais potente é uma célula estaminal, em mais tipos de células se pode tornar (Jin, 2017).

Quanto à escolha entre os diferentes tipos de células estaminais e suas fontes depende do tipo de doença, idade e características médicas do animal, bem como da urgência do tratamento (Markoski, 2016).

Tendo em conta o potencial de diferenciação, as células estaminais subdividem-se em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes (Kolios, & Moodley, 2013; Gonçalves, Ambrósio, & Piedrahita, 2014), como representado na Tabela 7.

Tabela 7: Tipos de células estaminais, consoante o potencial de diferenciação.

•	Células totipotentes	→ Células mais indiferenciadas; Presentes no início do desenvolvimento; Capazes de gerar um organismo completo.
•	Células pluripotentes	→ Capacidade de se autorrenovar indefinidamente; Capazes de se diferenciar em células que surgem das três camadas germinativas - ectoderme, endoderme e mesoderme.
•	Células multipotentes	→ Desenvolvem-se em muitos tipos de células diferentes a partir de uma única camada germinativa; Geralmente retiradas de adultos.
•	Células oligopotentes	→ Capazes de se autorrenovar e formar duas ou mais linhagens dentro de um tecido específico.
•	Células unipotentes	→ Capacidade de se autorrenovar e diferenciar em apenas um tipo específico de célula e formar uma única linhagem.

Relativamente à origem, existem três grandes grupos de células estaminais: as embrionárias (ESCs), as pluripotentes induzidas (iPSCs) e as adultas (Kolios, & Moodley, 2013; Quimby, 2018; Gugjoo *et al.*, 2019).

As ESCs são células pluripotentes que estão presentes no trofoblasto durante a embriogénese (Gugjoo *et al.*, 2019) e são derivadas da massa celular interna (ICM) do blastocisto, tendo a capacidade de formar tecidos de qualquer uma das três camadas germinativas primárias (Gonçalves *et al.*, 2014; Diederichs, & Richter, 2017). No entanto,

também podem ser mantidas em um estado indiferenciado por um período prolongado em cultura (Kolios, & Moodley, 2013). Além disso, também têm sido usadas para produzir cartilagem hialina *in vitro* e têm a capacidade de se autorrenovar, tornando-as uma cartilagem de substituição potencialmente ilimitada (Diederichs, & Richter, 2017). Por serem encontradas nos primeiros estádios da gravidez, estas são as células estaminais mais potentes (Jin, 2017).

Das principais desvantagens deste tipo de células destacam-se as problemáticas da ética; da acessibilidade; possível formação de teratoma (Menon, Patel, Joshi, & Kumar, 2019), embora pouco comum (Cardoso *et al.*, 2016); obstáculos imunológicos (Menon *et al.*, 2019) e evidências de instabilidade do genoma. Por outro lado, como as células embrionárias diferenciam os tecidos derivados das três camadas germinativas *in vivo*, a plasticidade e capacidade de potência das linhas de células geradas são diminuídas dentro das camadas (Markoski, 2016).

As células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) são produzidas a partir de células somáticas adultas (Kolios, & Moodley, 2013), podendo ser geradas a partir de qualquer tipo de célula inicial (Koh, & Piedrahita, 2014) e são geneticamente reprogramadas obtendo-se um estado com potencial semelhante ao das ESCs, (Kalamegam *et al.*, 2018) pelo que teratomas de ocorrência espontânea e tumores relacionados também se podem desenvolver a partir do seu uso (Kolios, & Moodley, 2013). No entanto, ao contrário dos ESCs, as iPSCs possuem multipotência que foi induzida artificialmente. A sua aplicação torna-se menos invasiva e, a nível humano, foi descrito que a partir da geração de iPSCs, se abriu a possibilidade de uso de células estaminais autólogas em casos de rejeição (Kalamegam *et al.*, 2018), sem as preocupações práticas ou éticas das ESCs (Koh, & Piedrahita, 2014).

As células estaminais adultas são multipotentes (Kalamegam *et al.*, 2018) e derivadas de tecido adulto (Kolios, & Moodley, 2013). Podem ser obtidas de muitos tecidos diferenciados e, de forma geral, a cada tipo de tecido corresponde um determinado tipo de célula estaminal adulta, incluindo medula óssea, gordura, osso, sangue periférico, cérebro, medula espinal, polpa dentária, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitélio da pele e do aparelho digestivo, córnea, retina, coração, fígado, pâncreas, entre outros (Bragança, Tavares, & Belo, 2010; Quimby, 2018).

As células estaminais adultas estão também presentes em tecidos fetais, na placenta e no cordão umbilical (Jin, 2017; Quimby, 2018). É de salientar que estas células têm uma capacidade muito menor de se autorrenovar, assim como uma capacidade de diferenciação

limitada (Kolios, & Moodley, 2013), quando comparadas com as ESCs (Cuervo *et al.*, 2014). No entanto, as células estaminais adultas são imunocompatíveis e o seu uso não é restrito por não levantarem preocupações éticas (Cuervo *et al.*, 2014; Cardoso *et al.* 2016; Wang *et al.* 2017; Quimby, 2018).

De entre as principais fontes de células estaminais com potencial terapêutico, segundo Bragança *et al.*, 2010, destacam-se as células estaminais hematopoiéticas (EH), neurais (EN), fetais do cordão umbilical (ECU) e mesenquimais (MSCs).

Uma vez que as MSCs foram as utilizadas nesta dissertação, será dada ênfase a este tipo celular. No entanto, são apresentadas as características e funcionalidades das restantes células estaminais no Anexo 5, Tabela 16.

As MSCs têm sido o foco de um tratamento emergente para a OA que, para além de aliviar os sintomas, oferece uma solução de longo prazo, mostrando um papel importante na modificação da doença, com inibição potencial da progressão e evidências recentes de reversão desse processo degenerativo (Freitag *et al.*, 2016), tanto no humano, como no cão, fornecendo uma alternativa de tratamento eficiente, reduzindo assim a necessidade de cirurgia (Kalamegam *et al.*, 2018). Estas células possuem um amplo potencial proliferativo (Götherström, 2007) e de autorrenovação (Pas *et al.*, 2017) e destacam-se pelas diversas funções relevantes para a doença em estudo (Figura 3). Estas são outro tipo de células multipotente (Bragança *et al.*, 2010), o que significa que se podem diferenciar em múltiplos, mas não em todos os tipos de tecido (Quimby, 2018).

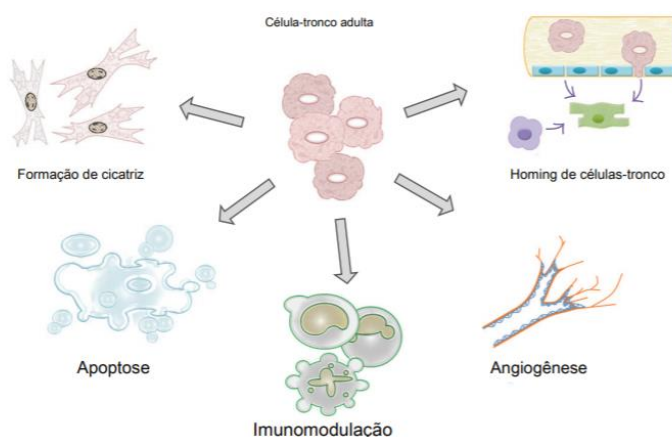


Figura 3: Diversas funções das células estaminais adultas (Adaptado de Markoski, 2016).

Estas células encontram-se geralmente presentes nos tecidos conjuntivos de quase todos os órgãos (Bragança *et al.*, 2010), como medula óssea, tecido adiposo, pele, músculo, tecido conjuntivo, osso trabecular (Götherström, 2007), líquido sinovial (Cuervo *et al.*, 2014),

placenta e, como demonstrado recentemente, da polpa dentária (Kichenbrand, Velot, Menu, & Moby, 2018). Como alternativa ao tecido adulto, os anexos fetais – líquido amniótico, membranas amnióticas e sangue do cordão umbilical – são uma fonte adicional de MSCs que têm maior plasticidade, taxa de proliferação e capacidade de se diferenciar em várias linhagens (Gonçalves *et al.*, 2014). No entanto, para fins terapêuticos, são mais convenientemente isoladas da medula óssea (BM-MSCs) (Bragança *et al.*, 2010) e do tecido adiposo (AD-MSCs) (Quimby, 2018), sendo estas últimas devido à presença de grande número de células, à simplicidade de colheita e isolamento (Alves *et al.*, 2014) e à facilidade desde a preparação até à implantação (Mirza, & Oussedik, 2017), sendo um método relativamente não invasivo, sem cirurgia ou internamento (Orozco *et al.*, 2013), tendo estas sido aplicadas no tratamento de lesões tendíneas, ligamentares e articulares, com relevância clínica significativa em cavalos e cães em condições ortopédicas (Markoski, 2016). Especificamente as BM-MSCs têm uma capacidade maior de se diferenciar em tipos de tecido do sistema músculo-esquelético em comparação com outras MSCs; no entanto, uma desvantagem dessas MSCs expandidas por cultura é o intervalo de tempo de 3 a 6 semanas desde a aspiração de medula óssea até o tratamento, pelo tempo necessário para o crescimento das MSCs (Fortier & Travis, 2011). Em relação às AD-MSCs, obtidas a partir de lipoaspiração (Kon, Filardo, Roffi, Andriolo, & Marcacci, 2012), a principal desvantagem é a necessidade de realização de pequenas cirurgias sob anestesia geral para captação de tecido adiposo, tendo como vantagem o maior benefício terapêutico alcançado (Cuervo *et al.*, 2014). Foi relatado que um obstáculo para seu uso é o potencial condrogénico inferior (Kon *et al.*, 2012).

Apesar das MSCs mais comumente utilizadas terem origem na medula óssea, ou no tecido adiposo, nos dias de hoje, tem sido crescente o estudo das células mesenquimais derivadas da membrana sinovial (SM-MSCs) e, nos últimos anos, estudos descobriram que têm forte capacidade de formação de cartilagem e reparação de tecidos (Li *et al.*, 2020).

Em 2001, De Bari, Dell’Accio, Tylzanowski, & Luyten isolaram SM-MSCs de diferentes origens (Figura 4) de articulações do joelho humano pela primeira vez, tendo descoberto que essas células tinham características de células estaminais e elevado potencial de diferenciação multidirecional *in vitro* superior às restantes MSCs.

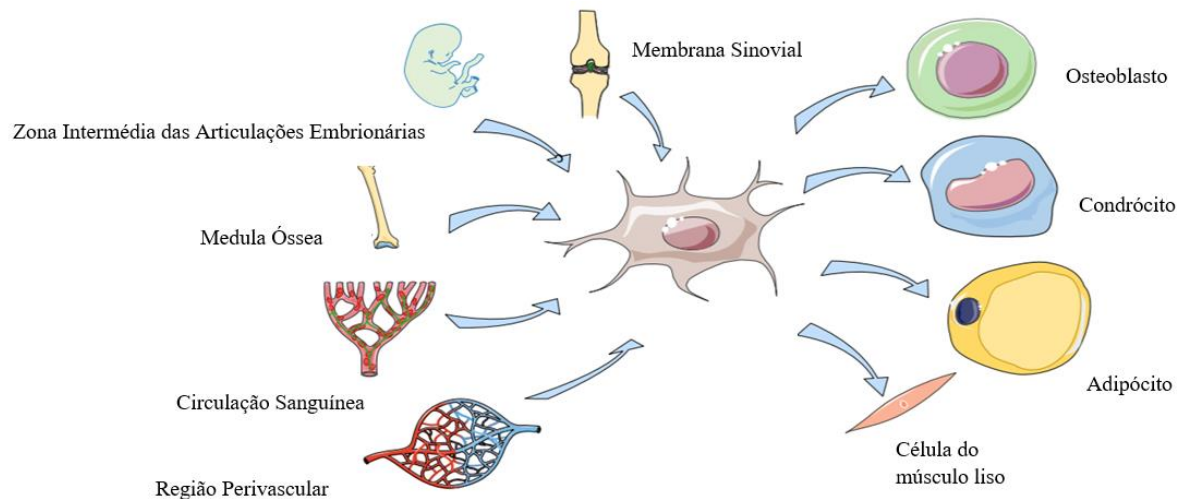


Figura 4: Diferentes fontes e potencial de diferenciação das células estaminais derivadas da membrana sinovial (Adaptado de Li et al., 2020).

Além disso, as principais vantagens deste tipo de células estaminais passam pela acessibilidade da fonte das células, pela sua elevada plasticidade, pela alta taxa de proliferação, pela baixa imunogenicidade e pelo maior potencial de diferenciação condrogénica, comparando com os outros tipos de MSCs (Sasaki *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020). Em estudos humanos é mesmo relatada uma maior capacidade de autorrenovação e expansão por parte das SM-MSCs e, tanto em medicina humana, como na medicina veterinária, este tipo de células tem uma ampla perspectiva de aplicação em doenças ósseas e articulares (Li *et al.*, 2020). Apesar do descrito, outro estudo refere que pesquisadores demonstraram que SM-MSCs podem inibir a progressão da OA, sendo estas particularmente adequadas para a reparação da cartilagem, sugerindo uma relação com o desenvolvimento dos condrócitos, mais do que a outras MSCs. Além disso, foi relatado que SM-MSCs sofrem mais prontamente a condrogénese do que BM-MSCs e AD-MSCs. No entanto, as SM-MSCs são difíceis de obter e as membranas sinoviais só podem ser obtidas por meio de uma abordagem invasiva (Zhu *et al.*, 2017).

No geral, todas as MSCs são capazes de se diferenciar em várias linhagens (Markoski, 2016) de origem mesenquimal, como osso, cartilagem e tecido adiposo, entre outros, *in vitro* e *in vivo* (Dominici *et al.*, 2006), sendo que relativamente aos dois primeiros têm mesmo capacidade para elevado grau de diferenciação (Bornes, Adesida, & Jomha, 2014). Sendo assim, dada esta capacidade de diferenciação e também de autorrenovação em várias linhagens,

elas podem ser usadas na reparação e regeneração de tecidos danificados (Götherström, 2007; Gugjoo et al. 2019), tendo um grande potencial para terapias diversas (Bragança *et al.*, 2010).

Além do descrito em cima, as MSCs, de acordo com os critérios formulados pela *International Society for Cellular Therapy*, são caracterizadas pelas suas propriedades de aderência plástica (Pas *et al.*, 2017); expressão de vários antígenos de superfície, incluindo CD44, CD73, CD 90 C e D105, e ausência de marcadores hematopoiéticos CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 (Hodgkiss-Geere *et al.*, 2012; Freitag *et al.*, 2016) e diferenciação em três linhagens mesodérmicas diferentes – osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Kalamegam *et al.*, 2018). Nesse contexto, sabe-se que as MSCs apresentam alto potencial de diferenciação em linhagens celulares osteogénicas e condrogénicas (Bornes, Adesida, & Jomha, 2014).

O conhecimento sobre como as células estaminais adultas modulam os sinais moleculares para ativar o *homing* celular também tem sido cada vez mais determinado, evidenciando os mecanismos que permitem às células reparar e regenerar tecidos lesados (Markoski, 2016), representados na Figura 5.

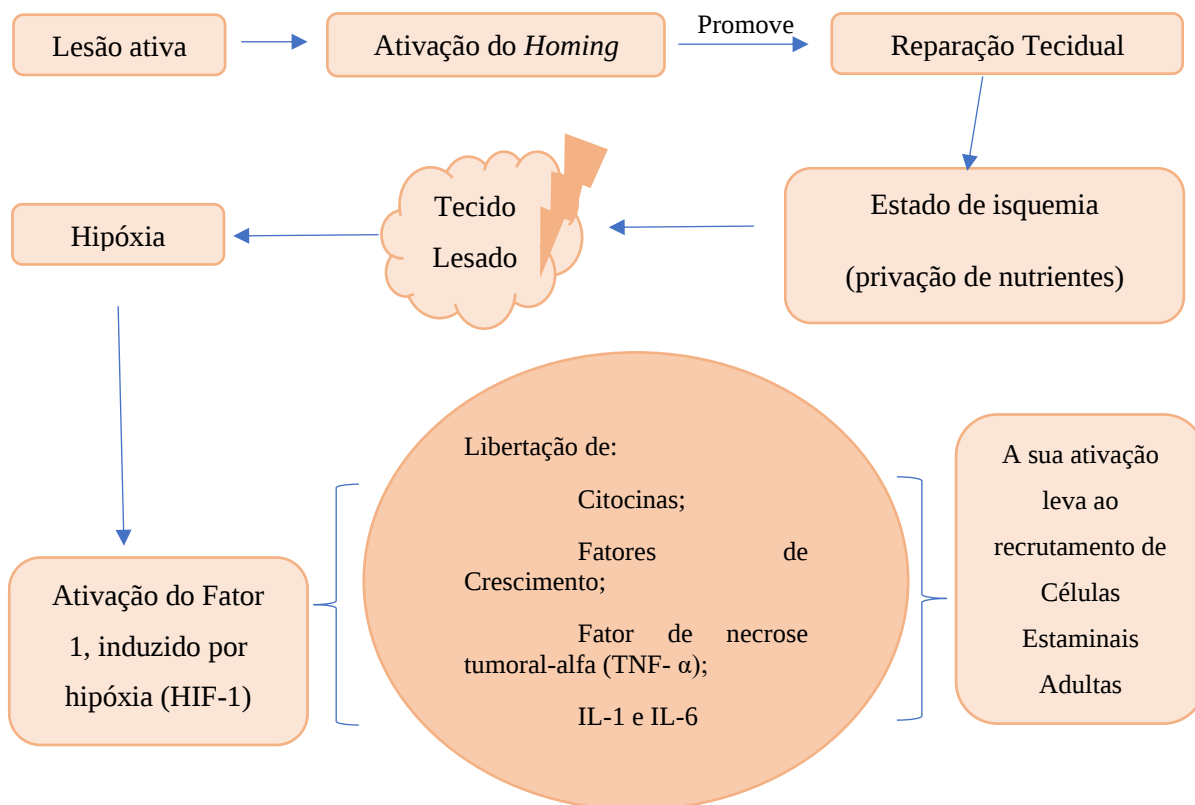


Figura 5: Mecanismos que permitem às células reparar e regenerar tecidos lesados (Original da autora).

Dado que a cartilagem articular exibe pouca ou nenhuma capacidade de autorreparação, a opção de introdução no local da lesão de OA uma fonte de células capazes de se diferenciar em condrócitos, parece ser uma opção terapêutica atraente (Mardones, Jofré, Tobar, & Minguell, 2017).

As MSCs intervêm principalmente ao nível sistémico, secretando fatores tróficos, promovendo viabilidade e proliferação celular ou angiogénese pela produção de fatores de crescimento. Estimulam, ainda, o recrutamento de células estaminais endógenas pela secreção de quimiocinas e reduzem a fibrose (Maumus *et al.*, 2018).

Outras funções das MSCs passam pela reposição de células mortas nos processos fisiológicos de renovação celular, assim como em situações patológicas como isquemia, inflamação ou trauma (Markoski, 2016); efeitos antifibróticos, imunomoduladores e anti-inflamatórios (Götherström, 2007), suprimindo a atividade de células T citotóxicas, células B e células Natural Killer (NK) (Bragança *et al.*, 2010); capacidade de modificar a resposta das células imunitárias inflamatórias por meio da supressão da proliferação de células T inflamatórias, inibição da maturação de monócitos e expressão de citocinas anti-inflamatórias (Götherström, 2007; Freitag *et al.*, 2019) e, ainda, controlo da atividade leucocitária e efeito anti-apoptótico (Kilchling, & Meyer-Lindenberg, 2018).

Mais interessante e de relevância para a doença artrítica e OA, é o papel imunorregulador potencial das populações de células estaminais. Este pode ser mediado pela libertação de moléculas de sinalização específicas, como o fator de crescimento transformador e fator de crescimento de hepatócitos pela população de células MSC, que aponta para as funções parácrinas críticas potenciais das populações de células estaminais *in vivo* (Luyten, 2004). O mecanismo imunomodulador aumenta o potencial para o seu uso em condições inflamatórias autoimunes, incluindo artropatias inflamatórias (Freitag *et al.*, 2016). Esta característica também resulta em tolerância por parte do sistema imunológico do recetor, permitindo o uso de células do dador geneticamente diferentes (alogénicas) e é muito apreciada em protocolos de transplante de células (Markoski, 2016).

Tendo em conta a utilização e a aplicação das MSC, estas podem ser introduzidas de forma autóloga ou alogénica (Vilar *et al.*, 2014), apresentando-se as vantagens e desvantagens de cada uma delas no Anexo 6, Tabela 17.

O facto de não se saber concretamente o tempo com que as células permanecem com eficácia, induz os investigadores a determinar objetivamente quanto tempo depois da primeira administração das células é recomendada outra semelhante, por forma a evitar uma recaída (Vogel, 2012).

Assim sendo, estudos com abordagem multimodal ocorrem tendo combinações com células estaminais, plasma rico em plaquetas e ácido hialurónico, como Freitag e colaboradores, em 2016, em medicina humana. Na medicina veterinária, a combinação entre células estaminais e plasma rico em plaquetas (Yamada e colegas, 2004), ou a combinação de plasma rico em plaquetas e ácido hialurónico referem essa abordagem multimodal com sucesso (Lee *et al.*, 2019).

1.6.3.1. Aplicações Da Terapia Com Células Estaminais Em Medicina Veterinária

Especificamente as MSC têm sido utilizadas principalmente para o tratamento de lesões de tendões, ligamentos, cartilagens e doenças ósseas e articulares como a OA (Markoski, 2016).

As lesões musculoesqueléticas em cães são as mais comumente tratadas (Fortier & Travis, 2011; Kilchling, & Meyer-Lindenberg, 2018), sendo que as doenças para as quais as células estaminais têm demonstrado eficácia incluem a osteoartrite; defeitos osteogénicos; defeitos periodontais como periodontite; lesões ligamentares/tendíneas como rutura do CCL; lesões musculares e doenças miocárdicas como cardiomiopatia dilatada (Gugjoo *et al.*, 2019). No entanto, também já têm sido utilizadas, embora não tão comum, para tratamento de tecidos não musculoesqueléticos como doença inflamatória intestinal; queratoconjuntivite seca e lesão medular (Gugjoo *et al.*, 2019). Além disso, as MSCs têm grande capacidade de causar processos de cicatrização (Markoski, 2016), sendo uma das outras aplicabilidades deste tipo de células a sua migração para áreas feridas, participando na cicatrização dos tecidos (Götherström, 2007).

Além das condições acima mencionadas, em cães, as MSCs também foram estudadas em outros problemas como doenças autoimunes, tais como diabetes *mellitus* (Gautam *et al.*, 2016) e lúpus eritematoso sistémico (Jorgensen, 2013); síndrome hepatocutânea; fibrose hepática e pulmonar; cirrose; doença renal crónica e lesão renal aguda (Kolios, & Moodley, 2013; Lee *et al.*, 2017; Quimby, 2018), com melhora da condição ou aumento na esperança média de vida (Gugjoo *et al.*, 2019). Estas células são ainda capazes de induzir uma neovascularização e redução da apoptose das células endoteliais e isquemia, tendo elevado interesse em doenças tromboembólicas. Além disso, *in vitro* e *in vivo*, contém muitos fatores

neuroprotetores, que podem melhorar as condições de saúde induzidas por doenças neurológicas como a doença de *Alzheimer* (Kichenbrand, Velot, Menu, & Moby, 2018).

1.6.3.2. Efeitos Secundários Da Aplicação Das Células Estaminais

Apesar de todas as vantagens da utilização destes diferentes tipos de células, com maior ênfase nas MSCs, a presença de efeitos colaterais neste tipo de terapia também foi investigada (Vilar *et al.*, 2014). Embora a maioria dos estudos não tenha relatado nenhum efeito adverso importante (Cuervo *et al.*, 2014), um estudo em cavalos apresentou, em apenas um caso, resposta inflamatória aguda moderada, tendo sido menos evidente em células autólogas (Pig, Ishihara, Wellman, Russell, & Bertone, 2013). Em cães, também houve um caso em que piorou após a injeção, mas que pode ter sido proveniente de uma técnica incorreta na administração das células (Vilar *et al.*, 2014). Outros estudos, mas de medicina humana, referem artralgia pós-injeção, assim como derrame articular e dificuldade de movimento (Pas *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019). É de salientar também que as células podem tornar-se ineficazes ou desenvolver características prejudiciais, como crescimento de tecido indesejado, desenvolvimento de tumores ou reações imunológicas, como referido anteriormente.

Parece claro que mais pesquisas são necessárias para o estudo de eventos adversos de médio a longo prazo (Lee *et al.*, 2019). No entanto, encorajadoramente, a maior parte dos estudos, tanto de medicina veterinária, como humana, forneceram evidências de eficácia e segurança no uso terapêutico das MSCs na OA (Freitag *et al.*, 2016), sobretudo se associada a outros procedimentos terapêuticos coadjuvantes (Gibbs *et al.*, 2015; Fotouhi *et al.*, 2018).

1.7. Procedimentos A Efetuar Para A Avaliação Do Efeito Das Células Estaminais

1.7.1 Procedimento De Exame De Reabilitação Funcional Dinâmico

O doente é estimulado à marcha, em trela curta, sempre no mesmo piso antiderrapante, em linha reta, cerca de 1 minuto, de modo a serem avaliados segundo a escala de pontuação de claudicação de Millis & Levine, 2014 (Anexo 3, Figuras 32 e 33). Neste procedimento, são ainda avaliadas simetrias e correlação entre membros torácicos e membros pélvicos.

1.7.2. Procedimento De Exame De Reabilitação Funcional Estático

O exame de abordagem estática inclui a avaliação do doente em estação, com apoio passivo ou assistido ativo dos membros pélvicos em estudo; a realização do teste de posicionamento propriocetivo, de modo a observar o *Knuckling*, ou seja, *déficit* de posicionamento propriocetivo; a palpação de todas as articulações e ossos longos, de distal para proximal e com alinhamento articular; a palpação dos ligamentos colaterais e cápsula articular;

a realização da amplitude articular de flexão e extensão (ROM de flexão e ROM de extensão), dentro da área de conforto do doente e ainda a palpação de edemas, seromas, áreas hiperémicas e quentes, pontos de dor (pontos de *stress* e de tensão) e processos fibróticos musculares.

1.7.3. Medição Da Amplitude Articular

No estudo, as articulações avaliadas foram a articulação coxofemoral e a articulação femuro-tibio-patelar. As linhas orientativas para a medição do ROM na articulação coxofemoral tanto no movimento de flexão, como de extensão, são medidas cruzando a linha que une o epicôndilo femoral lateral e o trocânter maior do fêmur com a linha que une a tuberosidade sagrada e a asa do ílio, formando, deste modo, um ângulo a medir (Millis Levine, 2014).

Quanto à articulação femuro-tibio-patelar, foi avaliado, do mesmo modo, o movimento de flexão e de extensão, tendo sido medidos os ângulos formados pelo eixo longo da diáfise tibial e a linha que une o epicôndilo femoral lateral e o trocânter maior (Millis Levine, 2014).

A medida registada como ROM máximo (flexão) e ROM máximo (extensão) foi considerada a amplitude articular obtida no momento inicial de desconforto por parte do doente.

1.7.4. Medição Da Massa Muscular

A medição da massa muscular é efetuada segundo as regras de Millis & Levine em 2014, que indicam medir a distância entre o trocânter maior do fêmur e o osso sesamóide lateral do músculo gastrocnémio, passando a fita *Gulick* tipo II no ponto representante a 70% distal desse segmento, a partir do trocânter maior. A partir desse ponto, coloca-se a fita em volta do membro, perpendicularmente ao eixo dos ossos longos, fazendo uma circunferência com a mesma. A execução do procedimento deve ser efetuada sem pressão, apenas com a força necessária para o aparecimento da bola vermelha do medidor de pressão, com leitura em centímetros (cm). Sabendo que o número, em cm, corresponde ao zero, o momento em que envolvemos o membro em estudo, é equivalente ao volume da massa muscular.

2. Objetivos

O presente estudo preliminar Coorte prospetivo pretende comprovar a tolerância, a eficácia, a repetibilidade e a segurança do protocolo multimodal de modalidades de reabilitação funcional e de medicina regenerativa por células estaminais. Para além disso, evidenciar a possibilidade de se tornar um protocolo multimodal acessível na prática clínica que permita o

prolongamento da esperança de vida dos cães geriátricos, assim como melhorar o seu bem-estar e a sua qualidade de vida.

III – Estudo Clínico

1. Materiais e Métodos

O presente estudo preliminar Coorte prospetivo foi realizado nos HVA, CRAA e CR²AL no período compreendido entre 14 de setembro de 2020 e 15 de dezembro de 2021. O estudo foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT) (Anexo 7, Figura 34) e os tutores obtiveram a informação inerente ao estudo clínico e assinaram o termo de consentimento (Anexo 8, Figura 35).

1.1. Apresentação Dos Participantes Do Estudo

Foram selecionados para o estudo apenas cães com idade superior ou igual a 2 anos, com peso superior ou igual a 15Kg, de raças de médio a grande porte e presença em exame físico e ortopédico de dor grave refratária a terapêutica convencional farmacológica e fisioterapia, em registo de cronicidade pela história pregressa. No registo de dor grave, apenas foram admitidos os cães que, segundo a escala de dor da Universidade de Colorado para dor crónica (Gaynor & Muir, 2015), demonstraram grau de dor igual ou superior a três em todos os itens da referida escala (Anexo 2, Figura 30). Demonstraram também claudicação de grau cinco, segundo a escala apresentada no Anexo 3, Figura 32 (Millis & Levine, 2014) e efetuaram exames complementares de diagnóstico radiográfico, tendo em conta a escala de classificação de Kellgren e Lawrence (Adaptado de Shah *et al.*, 2018) (Anexo 1, Figura 25), assim como tomografia computadorizada, confirmando a classificação de grau três no exame radiográfico, assim como a presença de osteofitose igual ou superior a dois (Murphy, Fink, Hunziker, & Barry, 2003) (Anexo 9, Tabela 18).

Deste modo, esta amostra dos participantes pretendeu representar a população de cães com osteoartrite crónica e recorrente que se tornou progressivamente grave com as classificações referidas anteriormente, em que a terapêutica convencional farmacológica e de fisioterapia não permitiram viabilidade funcional mais do que 3 a 6 meses.

A amostra do estudo foi composta por um total de oito cães (n=8) com idade igual ou inferior a 18 anos, peso vivo até aos 55,500Kg, com uma condição corporal igual ou superior a 5, numa escala de 1 a 9 (Anexo 10, Figura 36). Relativamente ao género, incluíram-se no estudo

tanto machos, como fêmeas e, quanto à raça foi aceite qualquer raça, independentemente de ser ou não uma raça definida.

Do estudo foram excluídos todos os cães sem os critérios referidos em cima, assim como todos os gatos.

A tomografia computadorizada (TC), sendo este um exame considerado útil para a avaliação de alterações ósseas e identificação de incongruências articulares e fragmentos em articulações, permitiu a avaliação das estruturas articulares sem sobreposição de outras estruturas. Para além disso, este exame imagiológico também fornece informações importantes relativamente à massa muscular perdida, em caso de atrofia. A TC efetuou-se fora do HVA/CRAA/CR²AL, na Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, sob supervisão do professor Doutor António Ferreira.

1.2. Desenho Do Estudo

Os doentes foram selecionados segundo os critérios de inclusão e dirigidos para a consulta de reabilitação e regeneração animal, de modo a realizar o exame físico direcionado ao sistema músculo-esquelético e ortopédico, abrangendo o exame de reabilitação funcional. Efetuou-se primeiro a avaliação da marcha com trela curta, sempre no mesmo corredor e em ambiente condicionado, seguido de exame de reabilitação funcional estático, começando sempre de distal para proximal, fazendo a avaliação da amplitude articular de flexão e extensão em todas as articulações, assim como nas articulações com ligamentos colaterais avaliar a resposta do doente após pressão.

A avaliação dos ossos longos, por palpação, procurou sinal clínico de dor, sinais de isquémia e tumefações. Após o referido, o exame foi direcionado à articulação coxofemoral, realizando-se a manobra de *Ortolani* e avaliando-se o nível de crepitação. Os doentes foram avaliados segundo as quatro escalas referidas anteriormente: a escala de dor da Universidade de Colorado para dor crónica (Anexo 2, Figura 30); a escala de pontuação de grau de claudicação (Anexo 3, Figura 32); a escala de classificação radiológica (Anexo 1, Figura 25) e a escala de presença de osteofitose (Anexo 9, Tabela 18).

Todo o procedimento descrito foi filmado com uma câmara *Canon EOS REBEL T6* (EOS 1300D), para posterior avaliação em câmara lenta.

O diagrama do estudo preliminar prospetivo da aplicação de protocolos multimodais de reabilitação funcional e regeneração em cães com OA grave encontra-se em seguida na Figura 6.

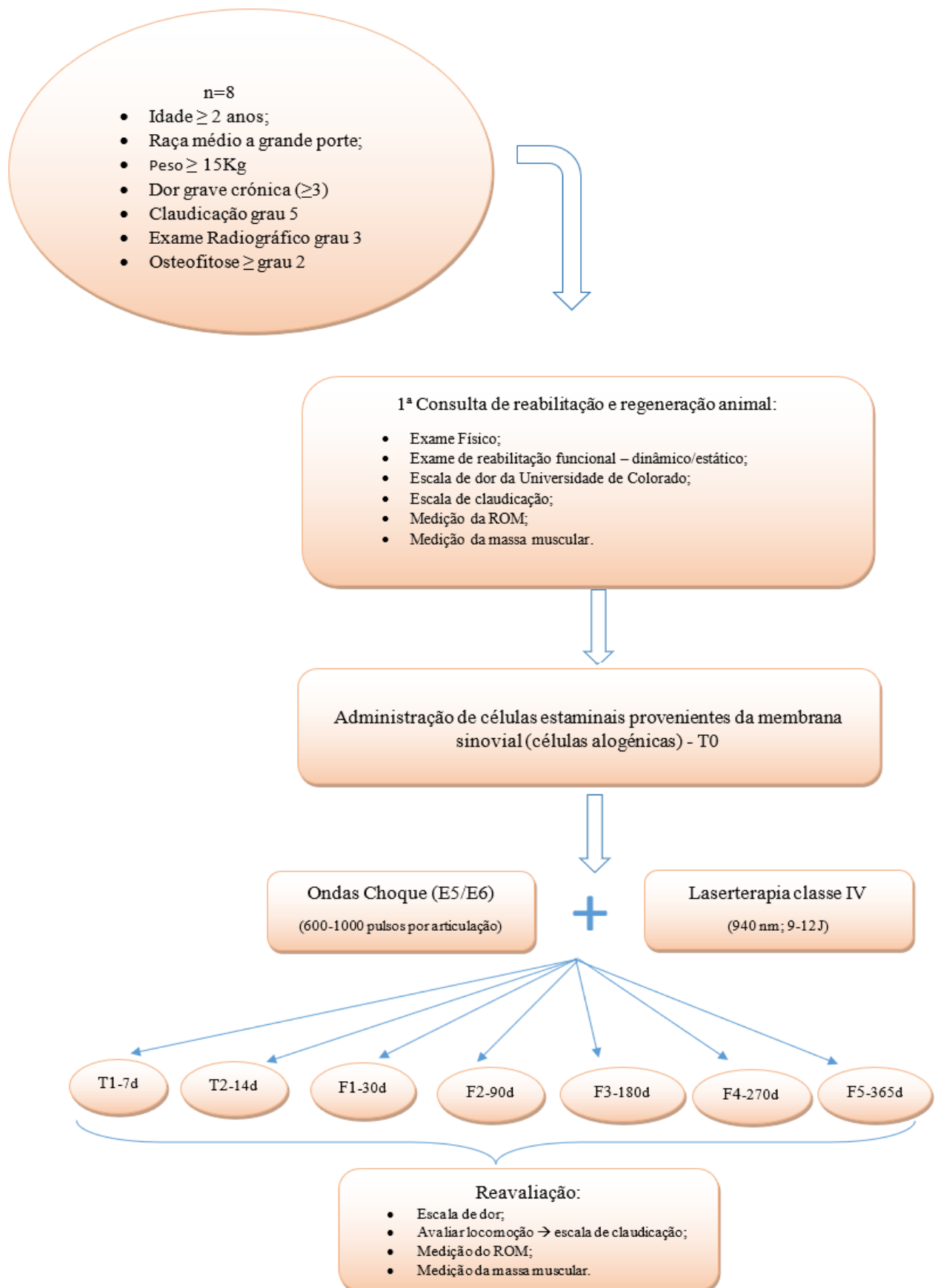


Figura 6: Organograma do estudo preliminar Coorte prospectivo da aplicação de protocolos multimodais de reabilitação funcional e regeneração em cães com osteoartrite grave (Original da autora). T= tempo; d= dias; F= *Follow-up*/Consulta de seguimento.

Os animais, após a seleção e a primeira consulta de reabilitação e regeneração animal, foram todos submetidos ao procedimento de medicina regenerativa através de injeções intra-articulares de células estaminais alogénicas da membrana sinovial, realizando logo em seguida a modalidade terapêutica de ondas-choque e, no próprio dia, assim como nos 5 dias sucessivos, protocolo de laserterapia classe IV para dor e inflamação tecidular.

Cada animal foi submetido a um exame estático e dinâmico segundo as diretrizes já mencionadas. Além disso, o procedimento da medição do ROM foi efetuado utilizando o goniómetro *standard* (Figura 7), sempre com o doente em decúbito lateral e o membro lesionado direcionado para cima, com alinhamento articular.



Figura 7: Representação fotográfica do goniómetro manual utilizado para as medições da amplitude articular (ROM) (Original da autora).

Para o procedimento de medição da massa muscular utilizou-se a fita *Gulick* tipo II, modelo 67020 (Figuras 8 e 9c). No estudo, as articulações avaliadas foram a articulação coxofemoral (Figura 9a) e a articulação femuro-tibio-patelar (Figura 9b).

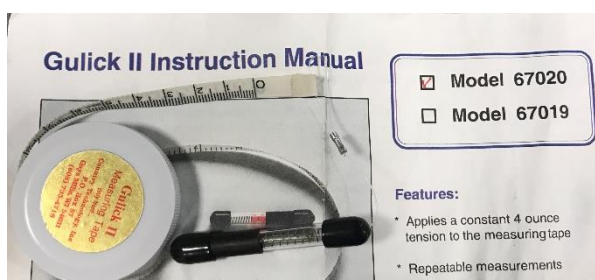


Figura 8: Representação fotográfica da fita *Gulick* tipo II utilizado para as medições da massa muscular (Original da autora).



Figura 9: Medição da amplitude articular em flexão com goniómetro na articulação coxofemoral (a) e na articulação femuro-tíbio-patelar (b). Medição da massa muscular com a fita Gulick tipo II (c) (Original da autora).

De notar que, tanto o procedimento de medição da amplitude articular, medição da massa muscular e procedimento de exame de reabilitação funcional dinâmico foram efetuados sempre pelo mesmo médico veterinário, sendo este instrutor/examinador de CCRP (*Certified Canine Rehabilitation Practitioner*) certificado pela Universidade do Tennessee, e ainda com observação por parte de um segundo médico veterinário, também certificado e monitor do CCRP.

O exame complementar radiográfico, para cada doente, incluiu três ou mais projeções radiográficas, tendo em consideração as vistas antero-posterior; antero-posterior comparativa e latero-lateral. Foram utilizados como equipamento os aparelhos das seguintes marcas *Carestream VXR* e *InTech* (Figuras 10 e 11).



Figura 10: Representação fotográfica da máquina de radiografia utilizada para recolha de imagens radiográficas (gentilmente cedidas pelo CR²AL).



Figura 11: Representação fotográfica da máquina de radiografia utilizada para recolha de imagens radiográficas (gentilmente cedidas pelo CRAA).

1.2.1. Procedimentos Efetuados Durante O Estudo

1.2.1.1. Preparação Das Células

As células do estudo consistiram em doses de células estaminais alogénicas da membrana sinovial, provenientes do Instituto de Ciências, Tecnologias e Agroambiente da Universidade do Porto (ICETA). Estas foram enviadas em tubos *Eppendorf*, em gelo, e suspensas em soro alogénico, em que cada dose preparada continha 5×10^6 células, apresentando uma viabilidade de cerca de 98% (viabilidade determinada a partir do *TrypanBlue Exclusion Assay*) e tendo sido a amostra sempre sujeita a avaliação microbiológica, pelo *General Lab - Laboratório de Análises Clínicas* (exemplo de análise microbiológica no Anexo 11, Figura 37).

1.2.1.1.1. Preparação E Inativação De Soro Autólogo

As células foram preparadas após a sua receção no CR²AL, iniciando-se a preparação e inativação de soro autólogo para meio de cultura das células estaminais.

O procedimento foi realizado num ambiente estéril em câmara de fluxo-laminar EuroGlone, s@femate EZ1.2 (Figura 12), tendo-se iniciado com a colheita de sangue do animal recetor (soro autólogo) até perfazer os 20 a 40 mililitros (ml), com seringas de 10 ml e agulhas de Gauge adequado a cada animal, tendo-se colhido o sangue lentamente através de venopunção da veia jugular interna. A venopunção foi realizada após tricotomia e assepsia com solução alcoólica de clorexidina a 4%. De seguida, a totalidade do sangue foi transferida para um ou mais tubos *Falcon* de 15 ml, dependendo do volume de sangue colhido e os tubos foram centrifugados na centrífuga (HERMLE, Z 306) a 2500-3000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos (Figura 13). Após isso, o soro foi transferido, cautelosamente, para um novo tubo *Falcon* estéril e descartado o depósito; colocou-se o tubo *Falcon* em banho-maria a 56°C durante 30 minutos e, de seguida, em gelo até arrefecer. Por fim, filtrou-se o soro com um filtro de 0,22 µm (Figura 14) para um novo tubo *Falcon* estéril. Para este passo, deve utilizar-se uma seringa com o volume necessário; retirar o êmbolo; acoplar o filtro ao corpo da seringa; transferir com uma pipeta de *Pasteur* estéril o soro para o corpo da seringa já acoplado ao filtro; colocar o conjunto corpo da seringa e filtro no topo de um novo tubo *Falcon* estéril; acoplar o êmbolo da seringa e transferir o soro através do filtro para o novo tubo *Falcon*.



Figura 12: Representação fotográfica da câmara de fluxo-laminar utilizada (gentilmente cedida pelo CR²AL).



Figura 13: Representação fotográfica da centrífuga utilizada (gentilmente cedida pelo CR²AL).



Figura 14: Representação fotográfica do filtro utilizado (gentilmente cedida pelo CR²AL).

1.2.1.1.2. Preparação Da Dose Desejada De Células Estaminais (Figuras 15 E 16)

No seguimento do procedimento anterior, exatamente com os mesmos critérios de esterilização, realizaram-se diversos passos, sempre em ambiente estéril em câmara de fluxo-laminar, iniciando-se com o aquecimento em banho-maria a 37°C e aquecimento de *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) e soro autólogo, seguido de aquecimento do tubo *Eppendorf* em banho-maria a 37°C. Logo após o mencionado, recolheu-se, rapidamente, o conteúdo do tubo *Eppendorf*, com pipeta de *Pasteur* e transferiu-se para um tubo *Falcon* estéril; adicionaram-se 2 ml de soro autólogo inativado, centrifugado e estéril ao tubo *Falcon* contendo as células, com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* estéril; adicionou-se DPBS estéril ao tubo *Falcon* até perfazer um volume de 10 ml; centrifugou-se a 1600 rpm durante 10 minutos; descartou-se o sobrenadante, virando num movimento único; adicionaram-se cerca de 2 ml de soro autólogo inativado, centrifugado e estéril ao precipitado de células – *pellet* – (cerca de 2

ml para cada articulação, variando consoante a dimensão) e, por fim, fez-se ‘*up and down*’ com a pipeta de *Pasteur* estéril, evitando formação de bolhas, de forma a desfazer o *pellet* celular e homogeneizar a suspensão celular.



Figura 15: Representação fotográfica do material necessário para a preparação de dose de células estaminais (gentilmente cedidas pelo CR²AL).



Figura 16: Representação fotográfica do material necessário para a preparação de dose de células estaminais (gentilmente cedidas pelo CR²AL).

1.2.1.2. Administração Das Células Intra-Articular

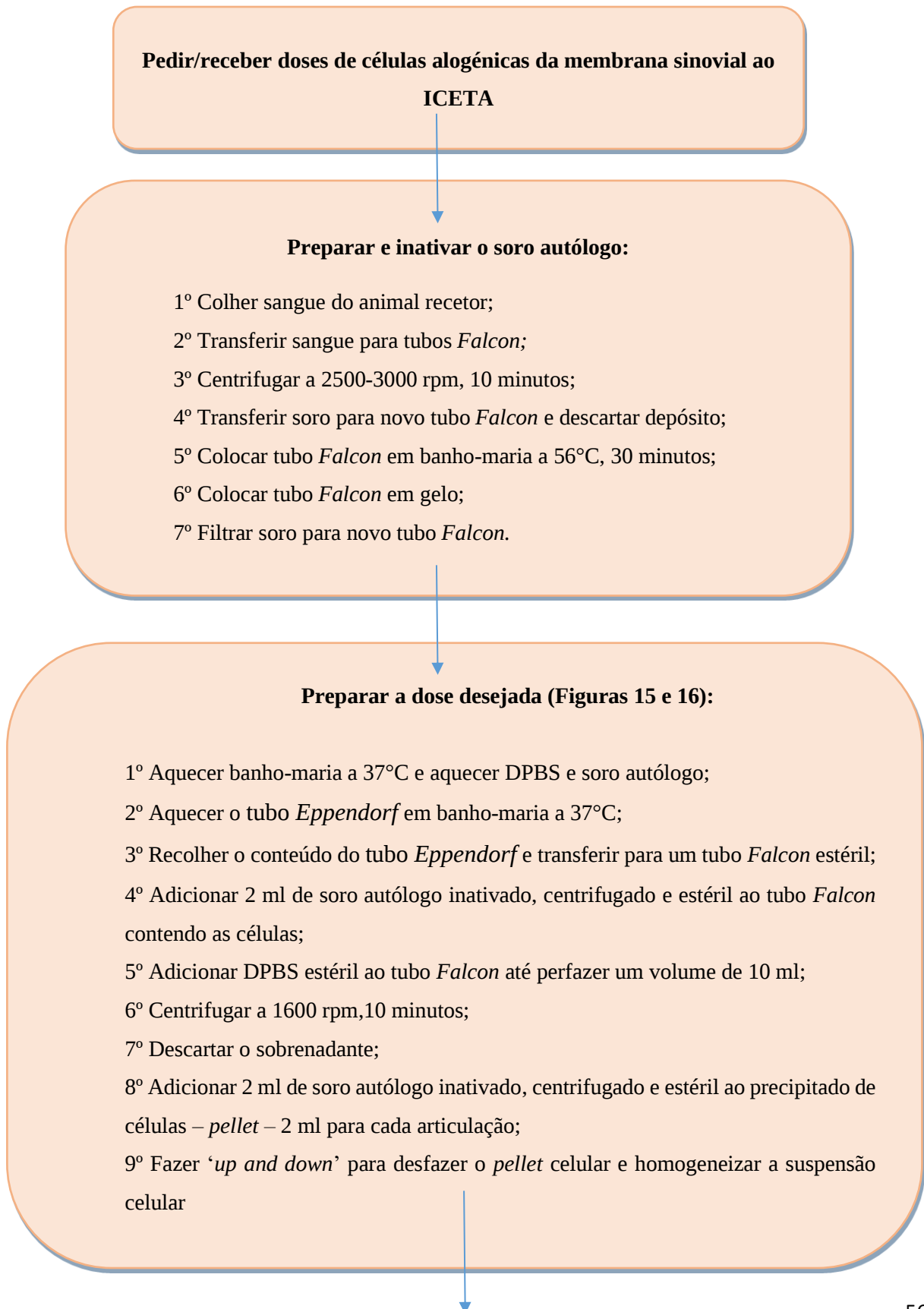
A administração das células intra-articular foi efetuada em ambiente assético após tricotomia da região cranioventral à articulação em estudo (Figura 17). Foi utilizada agulha de 18 Gauge e seringa de 2ml para a administração. Todos os doentes, antes da administração intra-articular, efetuaram o protocolo de neuroleptoanalgesia com midazolam 0,2mg/Kg, por via intravenosa (IV) e metadona 0,3 a 0,5mg/Kg também por via IV.



Figura 17: Administração das células estaminais na articulação coxofemoral no cão (gentilmente cedida pelo CR²AL).

A administração das células ocorreu por injeção de uma dose de células estaminais em cada articulação.

Para que o leitor tenha um acesso mais claro e sucinto de todos os pontos descritos, efetuou-se o algoritmo de todos os procedimentos até ao momento de administração intra-articular das células estaminais, associados às modalidades de reabilitação (Figura 18).



Pré-medicação + Administração das células + Modalidades de reabilitação (ondas-choque e laserterapia classe IV)

Figura 18: Diagrama do procedimento intra-articular desde a preparação das células até à sua administração (Original da autora).

1.2.1.3. Procedimento Da Modalidade De Ondas-Choque

Após a infiltração intra-articular das células estaminais, foram efetuadas ondas-choque com o equipamento V1435, *VersaTron 4 Paws*, *PulseVet* (Figura 19), tendo os parâmetros de energia 5 e 6 (E5 e E6) e de 600 a 1000 pulsos por minuto (ppm). Esta modalidade, realizada apenas no dia da administração das células, é efetuada após colocação de meio condutor (gel), segundo a manobra de quatro pontos em relação ao centro da articulação, seguida da manobra de varredura (Figura 20).



Figura 19: Equipamento PulseVet para modalidade de reabilitação de ondas (gentilmente cedidas pelo CR²AL).



Figura 20: Procedimento terapêutico de ondas-choque na articulação coxofemoral do cão (gentilmente cedidas pelo CR²AL).

Os doentes podem demonstrar desconforto, como tal foi-lhes administrado um fármaco hipnótico, sendo este o propofol, em regime de dose-efeito, iniciando-se com a dose de 2mg/kg e, sempre que foi necessário manter a estabilidade analgésica/anestésica, introduziu-se a anestesia volátil com isoflurano a 1%, mas com concentração alveolar mínima (CAM) de 0,5.

Todos os doentes foram medicados com metilprednisolona 1mg/Kg, IV, após a administração das células, de modo a prevenir reações anafiláticas e de hipersensibilidade tipo I e tipo II.

1.2.1.4. Procedimento Da Modalidade De Laserterapia

A modalidade de laserterapia foi realizada com o aparelho da marca *Mano Médical* LT10-3 (Figura 21), onde foi selecionado o programa, segundo as características individuais de cada doente, mas na categoria músculo-esquelética, com etiologia de osteoartrite. Este aparelho corresponde a um laser classe IV, permitindo uma penetração até 940 nanómetros (nm), onde a unidade terapêutica foi de 9 a 12 joules (J), durante 5 minutos e segundo a técnica de varredura, ao longo da articulação.



Figura 21: Aparelho utilizado nas sessões de laserterapia classe IV (gentilmente cedida pelo CR²AL).

1.2.1.5. Monitorização Dos Participantes Do Estudo

Os doentes foram monitorizados, ao longo do estudo, segundo a amplitude articular das articulações referidas anteriormente, a massa muscular envolvente a essas articulações e o exame de reabilitação funcional dinâmico, em marcha, dirigido ao membro em estudo. Aquando da monitorização, procedeu-se à sua reavaliação segundo as quatro escalas acima mencionadas: a escala de dor da Universidade de Colorado para dor crónica (Anexo 2, Figura 30); a escala de pontuação de grau de claudicação (Anexo 3, Figura 32); a escala de classificação radiológica (Anexo 1, Figura 25) e a escala de presença de osteofitose (Anexo 9, Tabela 18).

A monitorização foi realizada no momento da admissão (T0), ao fim de 7 dias (T1), após 14 dias (T2) representando a alta médica, seguido de consultas de seguimento ao fim de 30 dias da administração (F1), de 90 dias (F2), de 180 dias (F3), 270 dias (F4) e de 365 dias (F5).

Para melhor compreensão da esquemática dos diferentes procedimentos e monitorizações foi efetuado o organograma da Figura 6.

1.3. Recolha De Dados Clínicos

Os dados recolhidos da amostra do estudo (n=8) encontram-se descritos no Anexo 12, Tabelas 19, 26, 29 e 30, com as respetivas legendas no mesmo anexo, Tabelas 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27 e 28. A amostra populacional contemplou variáveis, sendo elas divididas em diversos grupos: relativamente à idade, foram distribuídos em idade igual ou inferior a 7 anos ou idade superior a 7 anos; relativamente ao peso vivo, foram agrupados em peso inferior ou igual a 35kg, ou peso superior a 35kg; com condição corporal inferior ou igual a cinco ou superior a cinco; género masculino ou género feminino; raça não definida ou raça definida; com osteoartrite na articulação coxofemoral ou na articulação femuro-tibio-patelar; com grau de dor à entrada e em F5, segundo a escala de dor da Universidade de Colorado para dor crónica, podendo variar de zero a nove; com grau da escala da dor na última consulta de seguimento realizada, agrupado em dor ligeira, moderada e grave, tendo sido considerado grau 0 a 2 da escala como dor ligeira, grau 3 a 6 como dor moderada e grau 7 a 9 como dor grave; com grau de claudicação à entrada e em F5, podendo variar de zero a cinco; com grau da escala de claudicação na última consulta de seguimento realizada, agrupado em claudicação ligeira, moderada e grave, tendo sido considerado grau 0 a 1 da escala como claudicação ligeira, grau 2 a 3 como claudicação moderada e grau 4 a 5 como claudicação grave. Por fim, o estudo também incluiu a medição do ROM do(s) membro(s) lesionado(s), incluindo a flexão e a extensão, ao longo do tempo – à entrada (T0), até ou igual a 7 dias (T1), até ou igual a 14 dias (T2), após 30 dias (F1), após 90 dias (F2), após 180 dias (F3), após 270 dias (F4) e após 365 dias (F5), assim como a medição da massa muscular do(s) membro(s) lesionado(s), incluindo a flexão e a extensão, ao longo do tempo – em T0, T1 e T2, seguidos dos momentos temporais F1, F2, F3, F4 e F5.

O doente é considerado com reabilitação funcional positiva (RFP) quando a escala de dor é classificada como ligeira na avaliação do ROM de flexão e extensão e quando o grau de claudicação é classificado como ligeiro.

1.4. Análise Estatística

A base de dados e análise estatística foram elaboradas, respetivamente, através dos programas informáticos Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, EUA) e o programa de análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences* versão 22.0 (IBM, EUA).

A análise estatística inferencial foi realizada para verificação da normalidade da amostra, através do teste de *Shapiro-Wilk* ($n < 50$), considerando $p > 0,05$ como confirmação da normalidade, tanto para a idade, como para o peso dos cães.

A análise estatística contemplou o teste *one sample T test* para comparação dos resultados obtidos com estudos publicados previamente, no que diz respeito às médias de idade, peso vivo e evolução clínica.

2. Resultados

O presente estudo foi composto por um total de oito cães ($n=8$), identificados no Anexo 13, Tabela 31. Esses cães apresentaram idades compreendidas entre 2 e 18 anos, com uma média de 9,5 anos e mediana e moda de 8 anos. Na amostra populacional verificou-se que 37,5% (3/8) dos cães tinha idade inferior ou igual a 7 anos e 62,5% (5/8) idade superior a 7 anos. Relativamente à idade, verificou-se uma distribuição normal, quer pelo teste de *Shapiro-Wilk* ($W(8)=0.926$, $p=0.477$), quer pela semelhança entre média, moda e mediana.

Na categoria peso, compreendida entre 15 e 55,5Kg, verificou-se uma média de 35,63 Kg, com mediana de 37, com 50% (4/8) dos cães com peso inferior ou igual a 35 Kg e 50% (4/8) com peso superior a 35 Kg, portanto a distribuição foi normal, comprovada também pelo teste de *Shapiro-Wilk* ($W(8)=0.938$, $p=0.589$).

Quanto à escala de condição corporal, com resultados compreendidos entre 5 e 8, chegou-se a uma média e mediana de 6,5. De entre o total de cães, 50% (4/8) enquadra-se na categoria inferior ou igual a cinco, estando os outros 50% (4/8) na categoria superior a cinco, demonstrando o balanceamento dos dados.

Na Tabela 8 encontram-se sumarizados os resultados quanto às categorias quantitativas contínuas de idade e de peso vivo.

Tabela 8: Dados estatísticos referentes à idade e ao peso vivo dos cães (Original da autora).

Idade, Peso Vivo e Condição Corporal						
	Média	Mediana	Moda	Desvio Padrão	SEM*	Variância
Idade	9,5	8	8	5,71	2,02	32,57
Peso Vivo	35,63	37	-	13,91	4,92	193,48

* SEM: *Standard error of mean*.

Relativamente ao género observou-se que 75% (6/8) foram do sexo feminino e 25% (2/8) do sexo masculino.

Quanto à raça, foram considerados de raça não definida 25% (2/8) da amostra populacional, contrastando com 75% (6/8) de raça definida. Entre os cães de raça definida (n=6), embora a amostra seja representada por uma panóplia de raças, a maior prevalência foi de 33,3% (2/6) Pastor Alemão. Além disso, verificou-se que 16,7% (1/6) eram da raça Boiadeiro de Berna, 16,7% (1/6) Pastor Belga, 16,7% (1/6) Pastor dos Pirenéus e 16,7% (1/6) Labrador *Retriever*.

Relativamente à localização da lesão, 25% (2/8) dos cães tinham osteoartrite na articulação femuro-tibio-patelar e 75% (6/8) na articulação coxofemoral.

O gráfico da Figura 22 permitiu constatar que 100% (8/8) dos cães apresentou dor grave em T0, em T2 62,5% (5/8) cães apresentaram dor moderada e 37,5% (3/8) apresentaram dor grave e todos os cães (n=4) que se apresentaram em F5 (365d) apresentaram dor ligeira.

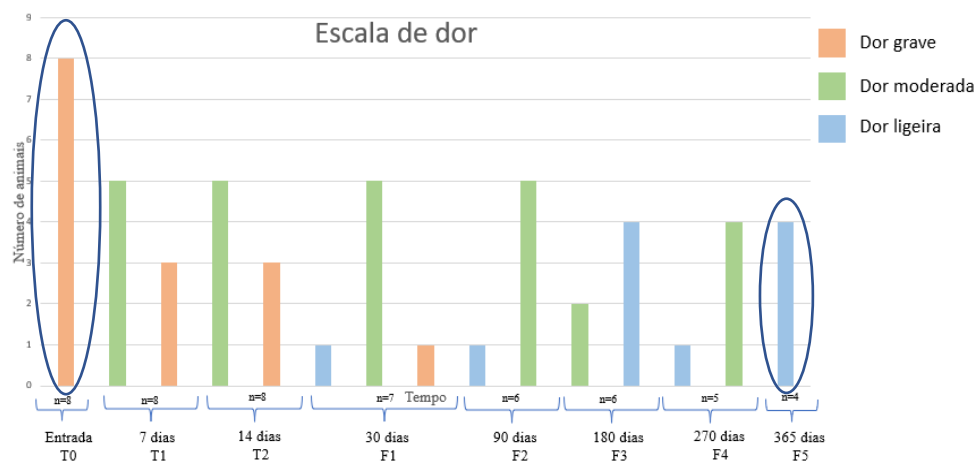


Figura 22: Evolução da escala de dor ao longo do estudo (Original da autora).

Na Tabela 9 evidenciam-se os resultados estatísticos relativamente à escala de dor, em T0 e na última consulta de seguimento de cada doente.

Tabela 9: Dados estatísticos referentes à escala de dor dos cães, em T0 e na última consulta de seguimento de cada doente (Original da autora).

Escala de dor (ED)						
	Média	Mediana	Moda	Desvio Padrão	SEM*	Variância
T0	9	9	9	0	0	0
Última consulta de seguimento	2,5	2	-	2,67	0,95	7,14

*SEM: *Standard error of mean*.

O gráfico da Figura 23 demonstrou que 100% (8/8) dos cães apresentou claudicação grave em T0, em T2, 75% (6/8) dos cães apresentaram claudicação moderada e 25% (2/8) apresentaram claudicação ligeira e todos os cães (n=4) que se apresentaram em F5 apresentaram claudicação ligeira.

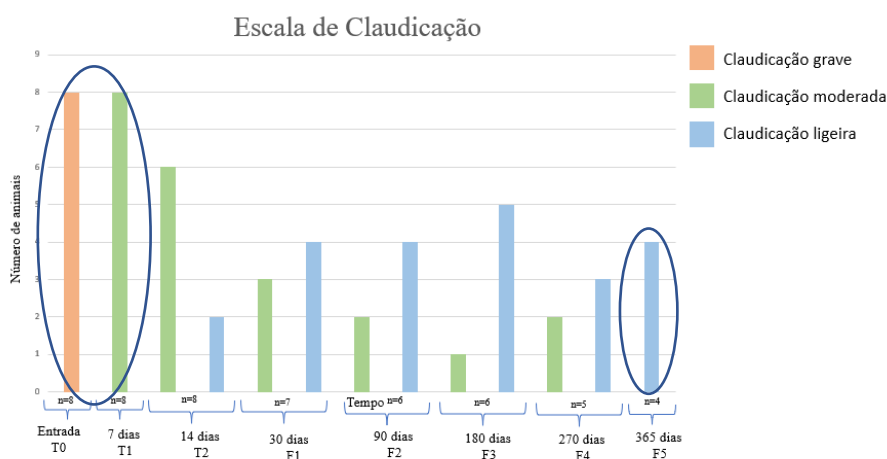


Figura 23: Evolução da escala de claudicação ao longo do estudo (Original da autora).

Na Tabela 10 evidenciam-se os resultados estatísticos relativamente à escala de claudicação, em T0 e na última consulta de seguimento de cada doente.

Tabela 10: Dados estatísticos referentes à escala de claudicação dos cães em T0 e na última consulta de seguimento de cada doente (Original da autora).

Escala de Claudicação (EC)						
	Média	Mediana	Moda	Desvio Padrão	SEM*	Variância
T0	5	5	5	0	0	0
Última consulta de seguimento	1,63	1,5	3	1,30	0,46	1,7

*SEM: *Standard error of mean*.

O tempo até à obtenção de funcionalidade foi condicionado pelo grau de dor e de claudicação apresentados pelos doentes em estudo, tendo-se verificado que, quanto à dor, 75% (6/8) atingiram a RFP ao longo do tempo de estudo, enquanto 25% (2/8) não atingiram, embora tenham saído do estudo em T2 (14d) e F1 (30d). Em média, em n=6, foram necessários 185,8 dias para obter RFP (entre 30 e 365d).

Relativamente à claudicação, 62,5% (5/8) dos doentes atingiram a RFP ao longo do tempo de estudo e 37,5% (3/8) não obtiveram, pois dois saíram em T2 (14d) e F1(30d) e o outro em F3 (180d) com dor ligeira, obtida em F1 (30d). Em média, os cinco doentes referidos demoraram 29,6 dias a atingir melhoria para claudicação ligeira (entre 14 e 60 dias).

Considerando a última consulta de seguimento realizada a cada doente, relativamente à escala da dor, 50% (4/8) apresentaram dor ligeira, 37,5% (3/8) apresentaram dor moderada e 12,5% (1/8) apresentaram dor grave. Quanto à claudicação, 50% (4/8) apresentaram claudicação ligeira e 50% (4/8) apresentaram claudicação moderada.

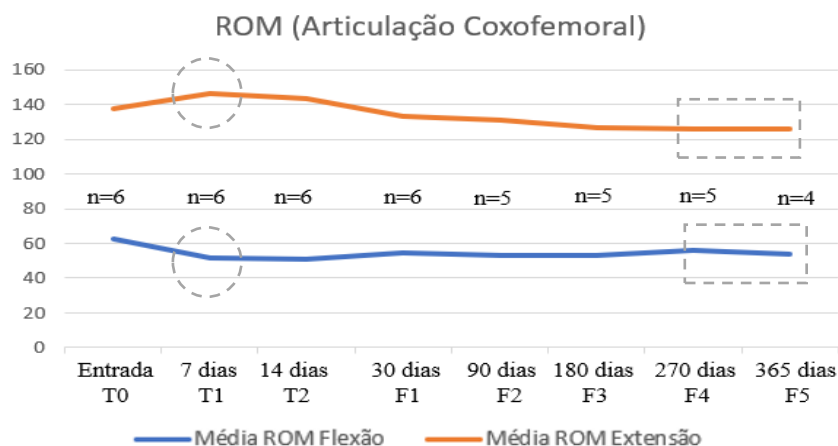
A Tabela 11 evidencia os valores máximos e mínimos nos momentos temporais de T0, T2 e última consulta de seguimento por doente, tanto do ROM, como da massa muscular. O ROM, em T0, teve variação dos valores entre 45° e 94° à flexão e entre 114° e 170° à extensão e a massa muscular compreendida entre 18 cm e 44 cm. Em T2, os valores à flexão foram entre 28° e 74° e à extensão entre 120° e 170°, com massa muscular entre 21 cm e 44,1 cm. Na última consulta de seguimento de cada doente, os valores à flexão foram entre 26° e 70° e à extensão entre 114° e 170°. A massa muscular nessa última consulta de seguimento foi compreendida entre 20 cm e 54 cm. Além disso, também é possível verificar na Tabela 11 os valores obtidos de ROM e de massa muscular, considerando a articulação lesionada.

Tabela 11: Evolução de ROM e de Massa Muscular em T0, T2 e na última consulta de seguimento de cada doente (Original da autora).

	ROM		Massa Muscular
	Flexão	Extensão	
T0 – Articulação femuro-tibio-patelar	45-90°	128-160°	18-37cm
T2 – Articulação femuro-tibio-patelar	28-50° 	158-170° 	21-38cm 
Última consulta de seguimento – Articulação femuro-tibio-patelar	26-60° 	158-170° =	20-49cm 
T0 – Articulação coxofemoral	52-94°	114-170°	32,5-44cm
T2 – Articulação coxofemoral	38-74° 	120-165° 	29-44,1cm 
Última consulta de seguimento – Articulação coxofemoral	38-70° =	114-165° = 	9-54cm 

 melhorou  piorou = nem melhorou, nem piorou

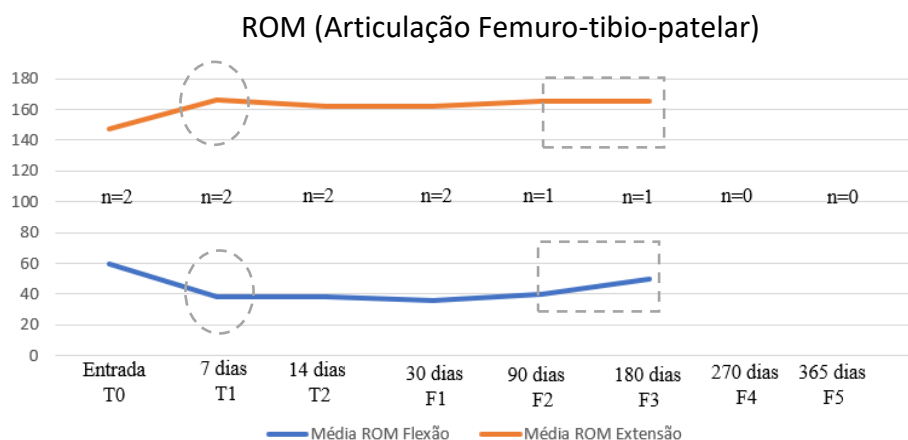
No Gráfico 4 está representada a média do ROM em relação à articulação coxo-femoral de todos os cães, havendo uma melhoria evidente entre T0 e T1, tanto à extensão, como à flexão, tendo-se mantido em T2. No entanto, ao longo das consultas de seguimento, verificou-se uma ligeira regressão.



*n:número de cães presentes na avaliação. T: Tempo. F: *Follow-up*/consulta de seguimento.

Gráfico 4: Média do ROM (flexão/extensão) dos cães que administraram células estaminais na articulação coxofemoral (Original da autora).

No Gráfico 5 encontra-se representada a média do ROM relativamente à articulação femuro-tibio-patelar de todos os cães, havendo uma melhoria evidente entre T0 e T1, tanto à extensão, como à flexão, tendo-se mantido em T2. No entanto, ao longo das consultas de seguimento, verificou-se uma ligeira regressão, no caso da flexão.

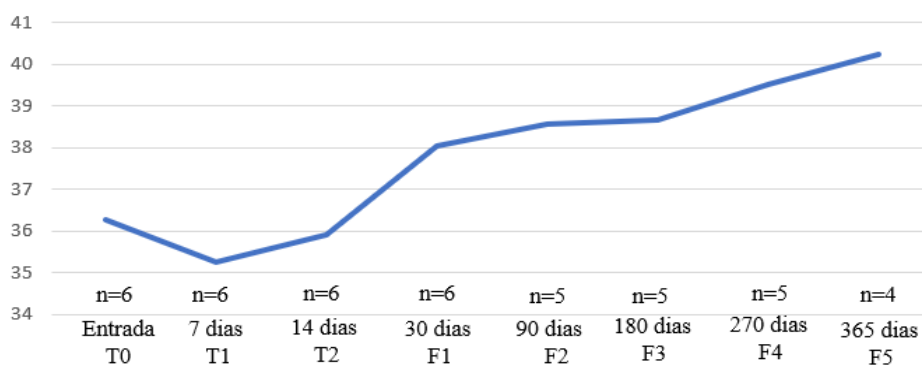


* n: número de cães presentes na avaliação. T: Tempo. F: *Follow-up*/consulta de seguimento.

Gráfico 5: Média do ROM (flexão/extensão) dos cães que administraram células estaminais na articulação Femuro-tibio-patelar (Original da autora).

Nos gráficos seguintes encontram-se representadas as médias da massa muscular de todos os cães, tanto relativa à articulação coxofemoral (Gráfico 6), como à articulação femuro-tibio-patelar (Gráfico 7), demonstrando uma constância nos resultados até T2, a seguir à qual houve uma melhoria evidente ao longo do estudo.

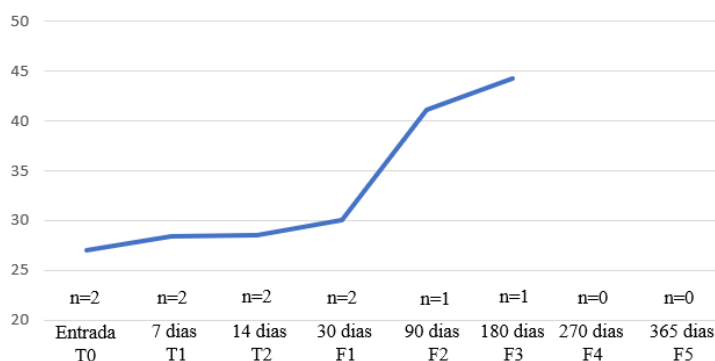
Massa Muscular (Articulação Coxofemoral)



n: número de cães presentes na avaliação. T: Tempo. F: *Follow-up*/consulta de seguimento.

Gráfico 6: Média da Massa Muscular dos cães que administraram células estaminais na articulação Coxofemoral (Original da autora).

Massa Muscular (Articulação Femuro-tibio-patelar)



n: número de cães presentes na avaliação. T: Tempo. F: *Follow-up*/consulta de seguimento.

Gráfico 7: Massa Muscular dos cães que administraram células estaminais na articulação Femuro-tibio-patelar (Original da autora).

O presente estudo foi composto por 8 cães (n=8), dos quais apenas 50% (4/8) compareceram às consultas até aos 365 dias após a administração das células estaminais (F5). Dos 4 cães (n=4) que não compareceram a todas as consultas de seguimento, 50% (2/4) faleceram, 25% (1/4) emigrou e 25% (1/4) teve rutura de ligamento cruzado, tendo faltado à última consulta de seguimento (Figura 24).

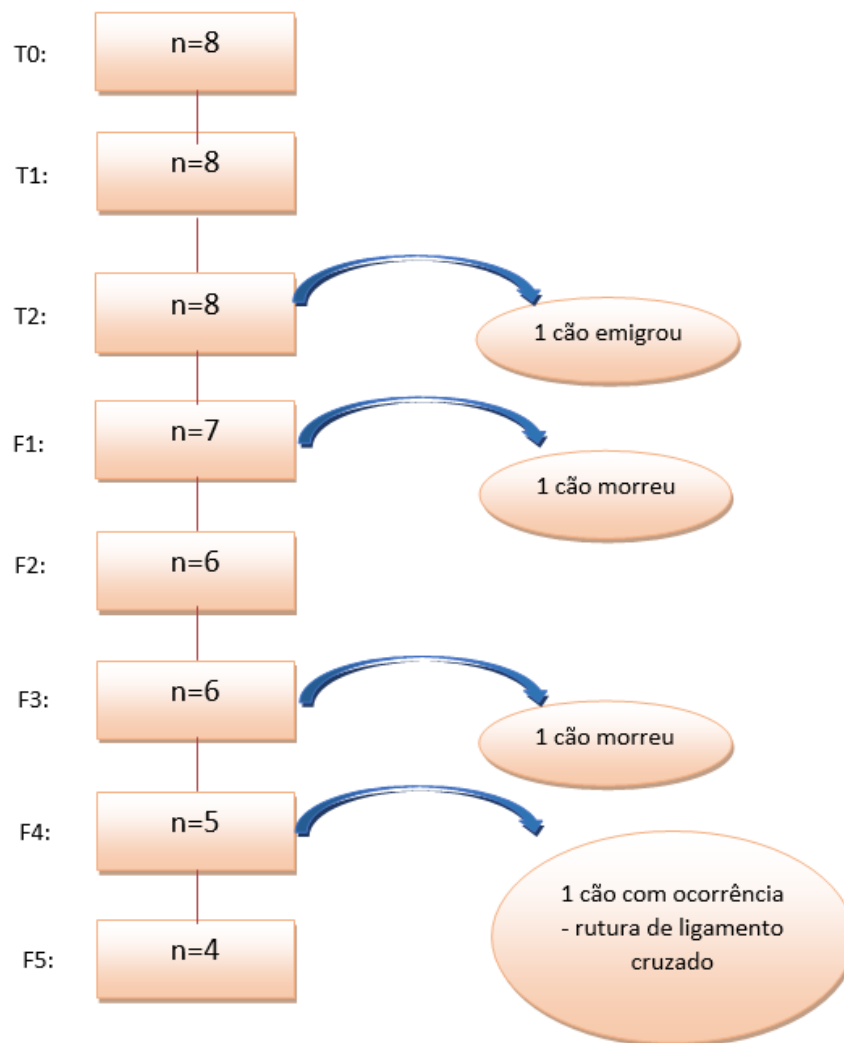


Figura 24: Representação esquemática do número de animais ao longo dos diversos momentos temporais (Original da autora).

O gráfico 8 demonstra a média calculada relativa à escala de dor dos cães ao longo do estudo. Em T0, a média da classificação de dor foi dor grave (grau 9). Até F3, a média da escala da dor decresceu (grau 2), aumentando em F4 (grau 3). Em F5, n=4, demonstrou a média da escala de dor próximo de zero, demonstrando total melhoria dos cães, ficando apenas com dor ligeira no final do estudo.



Gráfico 8: Média de escala de dor dos cães ao longo do estudo (Original da autora).

No gráfico 9 observou-se a média relativa à escala de claudicação dos cães ao longo do estudo. Em T0, n=8 apresentou média na escala de claudicação grave (grau 5). Em T1, verificou-se uma melhoria acentuada, com valores médios na escala de claudicação de grau 2, tendo continuado sempre a decrescer até F3 (grau 1). Em F4, a média sofreu um aumento, passando para grau 1,5. Em F5, com n=4, a média da escala de claudicação chegou próximo de zero, demonstrando melhoria exuberante dos 4 cães, ficando apenas com claudicação ligeira.

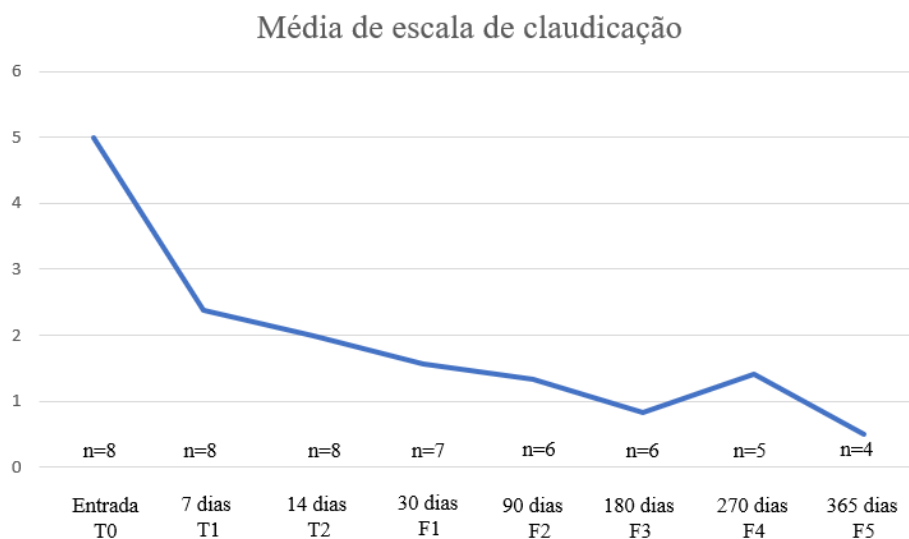


Gráfico 9: Média de escala de claudicação dos cães ao longo do estudo (Original da autora).

A realização de testes Chi-quadrado para as variáveis em estudo permitiu verificar ausência de associação significativa ($p>0,05$) entre as variáveis qualitativas binomiais “Idade”, “Peso vivo”, “Condição corporal”, “Género”, “Raça”, “Localização da lesão”, com os resultados obtidos na última consulta de seguimento de cada doente, tanto para a escala de dor, como de claudicação.

3. Discussão

A amostra populacional do presente estudo, em relação à presença de OA apenas em doentes considerados séniores, apresenta um fator de diferenciação, pois, no presente estudo, 37,5% (3/8) foram compreendidos em idade inferior ou igual a 7 anos, sendo possível o aparecimento em animais jovens/adultos, estando de acordo com Johnston, 1997; Harman *et al.*, 2016 e Pinna, Lanzi, Cordella, & Diana, 2019. No presente estudo, a média de idades foi de 9,5 anos, o que vai ao encontro de estudos como o de Barale *et al.*, em 2020. Pelo contrário, outros estudos referem idade média mais baixa, como o estudo de Marshall *et al.*, 2010 com média de idade 6,8 anos e o estudo de Sample *et al.*, 2017, com média de idade 5,5 anos.

Em relação à média de peso vivo do presente estudo, tendo sido esta de 35,6 Kg, está de acordo com diversos estudos, cujas médias rondam os 30Kg (Cuervo *et al.*, 2014; Harman *et al.*, 2016; Sample *et al.*, 2017; Pinna *et al.*, 2019). Contudo, Barale *et al.*, 2020 demonstrou uma média de peso vivo inferior, potencialmente devido ao facto de ter incluído mais fêmeas do que machos no seu estudo, para além de ter incluído raças de menor tamanho como Pug e Pinscher.

Já na medicina humana existe uma correlação entre a prevenção da OA e o aumento do peso em relação ao peso *standard*, assim como níveis de obesidade (mais de 20% do peso ideal - Marshall *et al.*, 2010), tendo-se em consideração a obesidade e a prevalência de OA na articulação coxofemoral, por influências biomecânicas (Murphy *et al.*, 2016). O mesmo ocorre entre obesidade e a presença de OA na articulação coxofemoral, em cães, podendo estar interrelacionado com a presença e formação de osteófitos periarticulares na respetiva articulação. Pelo contrário, não existem estudos que mostrem uma relação de significância entre a obesidade e a OA da articulação femuro-tibio-patelar (Kealy *et al.*, 2000). Apesar disso, o facto de os animais terem condição corporal mais elevada, será também um parâmetro a dificultar melhorias evidentes tanto em termos de sintomatologia, como em termos de ROM e massa muscular (Sullivan *et al.*, 2013).

Foi realizado o *One Sample T Test* para comparação de médias quanto à idade e peso vivo, comparativamente com bibliografia consultada, em relação aos resultados obtidos.

Um dos estudos comparativos foi o de Catarino e colaboradores, em 2020, que utilizou uma amostra incluindo cães de idade média de 11 anos, obtendo no *One Sample T test* $t(7)=-0.743$, $p=0.481$, podendo afirmar que ambas as amostras não são diferentes.

Ainda relativamente ao estudo de Catarino, ambos os estudos demonstram melhoria ao longo do tempo, sendo referido para a comparação, o dia 90, indicando que, no estudo de Catarino, a redução foi de cerca de 2 graus. Já no nosso, no mesmo tempo, a grande maioria decresceu o grau de claudicação superior a 2. Em relação à dor, os doentes do referido estudo demonstraram linear doloroso mais elevado, devendo ter em consideração o grau 9 da escala de dor em todos os doentes, no momento da admissão ao estudo. Apesar de ambos os estudos serem de medicina regenerativa, no de Catarino foi utilizado plasma rico em plaquetas.

Na comparação do presente estudo com o estudo de Cuervo *et al.*, 2014 (onde foram administradas células estaminais), o *p value*, utilizando o *One Sample T Test*, foi $t(7)=2.518$, $p=0.04$, indicando significância, resultante e podendo ocorrer diferenças entre as médias das idades para os respetivos grupos. Já no que se refere ao peso, o mesmo teste indica que não existem diferenças podendo, deste modo, comparar os grupos ($t(7)=0.147$, $p=0.887$), indicando que em ambos se observaram melhorias, embora o seguimento para Cuervo *et al.*, 2014 foi até 6 meses enquanto que em $n=4$ do nosso estudo foi de 12 meses, sugerindo a continuação da recuperação física.

Não se observou correlação estatisticamente significativa entre a presença de OA e o género nos diversos estudos, embora ocorra tendência para que as fêmeas apresentem maior prevalência com ou sem obesidade associada a OA do que os machos (Harman *et al.*, 2016; Kalamegam *et al.*, 2018; Pinna *et al.*, 2019; Barale *et al.*, 2020). Quanto à raça, não existe predisposição até porque surgiu uma panóplia de raças, contudo existe prevalência para as raças superiores a 25 Kg, tais como Pastor Alemão, Labrador *Retriever*, Golden *Retriever* e Cane Corso (Marshall *et al.*, 2010; Sample *et al.*, 2017; Pinna *et al.*, 2019; Barale *et al.*, 2020). No estudo da dissertação as raças incluem exemplos como o Pastor Alemão e o Labrador *Retriever*, como mencionado na literatura acima referida. Além disso, os estudos referidos anteriormente sugerem maior prevalência de cães de raça definida, face aos de raça indefinida, como comprovado no nosso estudo.

Como podemos suspeitar, os cálculos precisos da dor e da claudicação são extremamente subjetivos! Tendo em conta a literatura, observação de posturas e comportamentos não será igual para todos os observadores, mesmo sendo estes clínicos experientes (Vilar *et al.*, 2016). Acrescento que mesmo um só observador poderá ter opiniões diferentes face a um mesmo aspeto devido à dificuldade que é caracterizar uma postura ou comportamento de um animal. Para além disso, estudos referem que para diferentes animais, há comportamentos diferentes, tendo por base o mesmo tipo de dor - cães de pequeno porte têm tendência a não apoiar os membros (especialmente os pélvicos), procurando evitar a dor, ao contrário dos de grande porte que continuam a apoiar os membros no solo, procurando redistribuir o peso para o contralateral, aliviando a dor (Vilar *et al.*, 2016). – facto esse que vai ao encontro do que foi observado ao longo do estudo, tendo em conta a casuística apresentada.

As células mesenquimatosas são consideradas, por alguns autores, as mais corretas para medicina regenerativa (Kang *et al.*, 2012; Guercio *et al.*, 2013; Yaneselli *et al.*, 2018). O presente estudo tem como recurso as células mesenquimatosas alogénicas, com origem no tecido sinovial, apesar de não serem as que apresentam menor risco de complicações (Mizuno, Tobita, & Uysal, 2012), embora seja difícil determinar quais as melhores candidatas (Murata *et al.*, 2020).

Apesar do tipo de células utilizado poder não ter sido o mais seguro, não se observaram efeitos secundários, nem sinais de alergia cutânea como o referido em Shah *et al.*, 2018, mantendo, possivelmente, o objetivo da diferenciação das referidas células, em condrócitos, osteócitos e adipócitos (Rodríguez-Jiménez *et al.*, 2012), de modo a reduzir a degradação e degeneração das superfícies articulares (Guercio *et al.*, 2012). Além do referido, nenhum dos nossos cães desenvolveu infeções articulares após a administração das células, em contraste com Perkins *et al.*, 2018.

O presente estudo refere um protocolo de medicina regenerativa com a aplicação de células estaminais mesenquimatosas de origem alogénica, tendo sido comprovado em estudo laboratorial que as células mesenquimatosas alogénicas podem reduzir a degradação e degeneração da cartilagem (Mei *et al.*, 2017), sendo necessário comprovar a sua eficácia ao longo do tempo. Este facto levou ao prolongamento das consultas de seguimento do nosso estudo até 365 dias.

De acordo com vários estudos (Caplan, 2007; Black *et al.*, 2008, Guercio *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2018), na população estudada foram aplicadas o mesmo tipo etiológico de células

de origem alogénica numa panóplia de raças, tendo utilizado como variáveis de resposta a escala de dor e a escala de claudicação. Em todos eles se verificou que o procedimento foi seguro e eficaz, obtendo melhoria quanto à qualidade de vida

O estudo presente segue a linha orientativa, quanto ao método utilizado, com o estudo de Shah *et al.*, 2018, pois este último refere que a administração intra-articular é superior quanto à eficácia, em relação à administração intra-venosa, embora o seu estudo não apresente seguimento ao longo do tempo.

O presente estudo indica melhorias em relação a T0 durante 365 dias em, pelo menos, 4 cães, contrastando com Zeira *et al.*, 2018, que indica que o uso da medicina regenerativa com células estaminais mesenquimatosas reduz a dor e melhora a funcionalidade pelo menos até os 6 meses, principalmente se na entrada ao estudo a gravidade da OA seja elevada. Em âmbito clínico, a avaliação da evolução das escalas de claudicação/dor, ROM e massa muscular são essenciais, tendo grande parte dos estudos apenas consultas de seguimento até os 6 meses (Black *et al.*, 2008; Guercio *et al.*, 2012; Vilar *et al.*, 2013; Cuervo *et al.*, 2014; Marx *et al.*, 2014; Vilar *et al.*, 2014; Harman *et al.*, 2016; Gugjoo *et al.*, 2019; Alves, Santos, Jorge, Lavrador, & Carreira, 2020), sendo essencial concluir, para além de considerar a terapêutica adjuvante ao tratamento convencional, conhecer o seu efeito por mais de 6 meses, acreditando serem primordiais as consultas de seguimento ao longo do tempo (Matas *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019).

No estudo da dissertação, apenas se recorreu a uma administração intra-articular de células, tendo pretendido potenciar a sua ação com as modalidades de reabilitação. Uma única administração foi observada em Lee *et al.*, 2019, concluindo que algumas pessoas obtiveram melhorias após os 6 meses, colocando-nos a pensar se a evolução obtida pelas várias variáveis de resposta todas em linhas ascendentes são devido à administração intra-articular das células mesenquimatosas, ou às modalidades de regeneração e reabilitação animal ou, ainda, à associação de ambas.

A comparação com os estudos de medicina humana deveu-se ao facto de ambos terem em comum a doença degenerativa articular crónica, podendo, deste modo, potenciar a vertente de estudos em ambas as espécies (Zucconi *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2018; Menon *et al.*, 2019). Sendo os estudos em medicina veterinária escassos, verificou-se que, tal como em medicina humana (Pak *et al.*, 2011), o ROM de flexão e extensão aumentou em amplitude de T0 até F5.

Nos resultados do nosso estudo, podemos verificar a média do ROM flexão e extensão nas articulações coxofemoral e femuro-tibio-patelar, obtendo melhoria entre T0 e T1, seguida de constante melhoria até à última consulta de seguimento. A apresentação de linha progressiva da capacidade funcional, mantendo este efeito lento e máximo até 365 dias, está de acordo com o verificado por Orozco *et al.*, 2013, na medicina humana, assim como em estudos laboratoriais (Kondo *et al.*, 2017; Zellner *et al.*, 2017).

No nosso estudo foi possível observar que a média da massa muscular dos cães, em ambas as articulações, melhora a partir de T1 (tendo sido exponencial entre T2 e F1) até à última consulta de seguimento, não estando de acordo com Coleman *et al.*, 2010, da medicina humana, pois, para estes investigadores, é sugerido que as células têm capacidade limitada quanto à diferenciação miogénica, logo ponderada justificação com análise cuidadosa pode sugerir as modalidades regenerativas de reabilitação como uma das possíveis causas para tal efeito.

No estudo da dissertação não foram avaliadas relações significativas (teste Chi-quadrado) entre a idade e a RFP, como é referido na medicina humana por Ruiz *et al.*, 2015 e Dudics *et al.*, 2009. A recuperação notória quanto à RFP sugere indicar que a aplicação da medicina regenerativa o mais rápido possível será fundamental para o novo paradigma de recuperação da cartilagem (McGonagle, Baboolal, & Jones, 2017; Gugjoo *et al.*, 2019).

No nosso estudo, os cães com idade igual ou inferior a 7 anos apresentaram melhorias mais exuberantes, o que está de acordo com o que Shah *et al.*, 2018 refere, refletindo que há melhorias mais acentuadas nas escalas de dor e claudicação e, portanto, com uma doença menos avançada e uma articulação menos desgastada em animais mais jovens, quando comparados com os mais velhos e com um maior nível de cronicidade.

Tendo em conta a literatura, pensa-se cada vez mais noutras estratégias como a de associar as células estaminais a outro tipo de terapêutica, como a associação com plasma rico em plaquetas, já que um efeito muito mais duradouro foi demonstrado na literatura (Vilar *et al.*, 2013; Vilar *et al.*, 2014). Apesar disso, observou-se que poucos ou nenhum estudos associassem as modalidades de regeneração e reabilitação funcional com a medicina regenerativa de células estaminais, sendo o presente estudo pioneiro na temática. Para além disso, o presente estudo preliminar e inovador obteve características de segurança, tolerância e eficácia, apesar do número reduzido da amostra, conseguindo diminuir as abordagens farmacológicas da dor. Nos resultados do estudo foi verificado, em relação à escala de dor, uma evolução de 100% de dor grave em T0, para 100% em F5 de dor ligeira, estando de acordo com

a escala de claudicação, indicando 100% de claudicação grave em T0 e 100% de claudicação ligeira, em F5, comprovando assim que a elaboração deste estudo preliminar permitiu bem-estar aos doentes.

Como limitações ao estudo inclui-se a não elaboração do critério de satisfação por parte dos tutores, assim como a aplicabilidade de células alogénicas, em vez de autólogas, uma vez que eram as que o laboratório tinha disponíveis e que estava a testar a sua implementação. Além disso, o facto de não se ter incluído a ressonância magnética também se considera uma limitação, pois esta é considerada a técnica de imagiologia mais importante para avaliar a degradação da cartilagem (Venkatalaxmi, Padmavathi, & Amaranath, 2004; Guerhazi *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2019), como referido na medicina humana (Song *et al.*, 2018). Outra limitação passa por ter presente como variáveis de resposta a escala de dor e a de claudicação sem ter a concordância entre inter-observadores e intra-observadores, para promover redução da subjetividade inerente a ambas (Vilar *et al.*, 2016). O mesmo pode ser referido quanto ao ROM e à massa muscular (Egger *et al.*, 2014; Millis & Levine, 2014).

4. Conclusão

O presente preliminar Coorte prospetivo estudo demonstrou quanto ao protocolo multimodal de modalidades de reabilitação funcional e de medicina regenerativa através das células estaminais mesenquimatosas alogénicas ter sido eficaz, tolerante, repetível e seguro. Para além disso, permitiu concluir que através das consultas de seguimento ao longo do tempo, durante 365 dias, foi possível encontrar qualidade de vida e bem-estar, tendo reduzido a dor e a claudicação para níveis residuais. Deste modo, a avaliação prolongada da resposta à terapêutica instituída será importante para a prática clínica.

5. Referência Bibliográfica

1. Akyuz, G., & Kenis, O. (2014). Physical Therapy Modalities and Rehabilitation Techniques in the Management of Neuropathic Pain. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 93(3), 253– 259. doi:10.1097/phm.0000000000000037

2. Altman, R. D., & Gold, G. E. (2007). Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15, A1–A56. doi:10.1016/j.joca.2006.11.009
3. Alves, E. G., Serakides, R., Boeloni, J. N., Rosado, I. R., Ocarino, N. M., Oliveira, H. P., ... Rezende, C. M. (2014). Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. *BMC Veterinary Research*, 10(1). doi:10.1186/s12917-014-0190-y
4. Alves, J. C., Santos, A., Jorge, P., Lavrador, C., & Carreira, L. M. (2020). A report on the use of a single intraarticular administration of autologous platelet therapy in a naturally occurring canine osteoarthritis model - a preliminary study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 21(1), 127–. doi:10.1186/s12891-020-3140-9
5. Barale, L., Monticelli, P., Raviola, M., & Adami, C. (2020). Preliminary clinical experience of low-level laser therapy for the treatment of canine osteoarthritis-associated pain: A retrospective investigation on 17 dogs. *Open Veterinary Journal*, 10(1), 116-119. doi:10.4314/ovj.v10i1.16
6. Barger, B. K., Bisges, A. M., Fox, D. B., & Torres, B. (2020). Low-Level Laser Therapy for Osteoarthritis Treatment in Dogs at Missouri Veterinary Practices. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 56(3). doi:10.5326/jaaha-ms-6851
7. Baxter, G. D., & McDonough, S. M. (2007). Principles of Electrotherapy in Veterinary Physiotherapy. *Animal Physiotherapy*, 177–186. doi:10.1002/9780470751183.ch10
8. Bell, A. (2018). A neurobiologia da dor aguda. *The Veterinary Journal*, 237, 55-62. doi: 10.1016 / j.tvjl.2018.05.004
9. Black, L. L., Gaynor, J., Adams, C. Dhupa,S., Sams, A. E., Taylor, R., ... Harman, R. (2008). Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Veterinary Therapeutics*, 9(3), 192–200
10. Blum, A., Raymond, A., & Teixeira, P. (2015). Strategy and optimization of diagnostic imaging in painful hip in adults. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, 101(1), S85–S99. doi:10.1016/j.otsr.2014.11.002
11. Bonnechère, B., & Van Sint Jan, S. (2019). Rehabilitation. *DHM and Posturography*, 541–547. doi:10.1016/b978-0-12-816713-7.00039-8

12. Bornes, T. D., Adesida, A. B., & Jomha, N. M. (2014). Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Research & Therapy*, 16(5). doi:10.1186/s13075-014-0432-1
13. Bragança, J., Tavares, A., & Belo, J.A. (2010). Células estaminais e medicina regenerativa: Um admirável mundo novo. Retrieved from http://www.spn.org.pt/docs/canal%20bq_stem%20cells.pdf.
14. Burrage, P., S. (2006). Matrix Metalloproteinases: Role In Arthritis. *Frontiers in Bioscience*, 11(1), 529. doi:10.2741/1817
15. Caplan, A. I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 341–347. doi:10.1002/jcp.21200
16. Cardoso, M., Pinheiro, A., Vidane, A., Casals, J., de Oliveira, V., Gonçalves, N., ... Ambrósio, C. (2016). Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 58–64. doi:10.1111/rda.12832
17. Catarino, J., Carvalho, P., Santos, S., Martins, Â., & Requicha, J. (2020). Tratamento da osteoartrite canina com plasma rico em plaquetas alogénico: revisão de cinco casos. *Open Veterinary Journal*, 10(2), 226–231. doi:10.4314/ovj.v10i2.12
18. Chaganti, R. K., & Lane, N. E. (2011). Risk factors for incident osteoarthritis of the hip and knee. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 4(3), 99–104. doi:10.1007/s12178-011-9088-5
19. Chang, Y-H., Liu, H-W., Wu, K.-C., & Ding, D.-C. (2016). Mesenchymal Stem Cells and Their Clinical Applications in Osteoarthritis. *Cell Transplantation*, 25(5), 937–950. doi:10.3727/096368915X690288
20. Chung, H., Dai, T., Sharma, S. K., Huang, Y.-Y., Carroll, J. D., & Hamblin, M. R. (2012). The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Annals of Biomedical Engineering*, 40(2), 516–533. doi:10.1007/s10439-011-0454-7
21. Coleman, C. M., Curtin, C., Barry, F. P., O'Flatharta, C., Murphy, J. M. (2010). Mesenchymal Stem Cells and Osteoarthritis: Remedy or Accomplice?. *Human Gene Therapy*, 21(10), 1239–1250. doi:10.1089/hum.2010.138

22. Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. (2009). Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), 1–32. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135531
23. Cuervo, B., Rubio, M., Sopena, J., Dominguez, J., Vilar, J., Morales, M., ... Carrillo, J. (2014). Hip Osteoarthritis in Dogs: A Randomized Study Using Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Plasma Rich in Growth Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 13437–13460. doi:10.3390/ijms150813437
24. Dahlberg, J., Fitch, G., Evans, R. B., McClure, S. R., & Conzemius, M. (2005). The evaluation of extracorporeal shockwave therapy in naturally occurring osteoarthritis of the stifle joint in dogs. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 18(03), 147–152. doi:10.1055/s-0038-1632954
25. Danova, N. A., & Muir, P. (2003). Extracorporeal shock wave therapy for supraspinatus calcifying tendinopathy in two dogs. *Veterinary Record*, 152(7), 208–209. doi:10.1136/vr.152.7.208
26. De Bari, C., Dell’Accio, F., Tylzanowski, P., & Luyten, F. P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*, 44(8), 1928–1942. doi:10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::aid-art331>3.0.co;2-p
27. DeLemos, B. P., Xiang, J., Benson, C., Gana, T. J., Pascual, M. L. G., Rosanna, R., & Fleming, B. (2011). Tramadol Hydrochloride Extended-Release Once-Daily in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee and/or Hip: A Double-Blind, Randomized, Dose-Ranging Trial. *American Journal of Therapeutics*, 18(3), 216–226. doi:10.1097/mjt.0b013e3181cec307
28. Delius, M., Draenert, K., Al Diek, Y., & Draenert, Y. (1995). Biological effects of shock waves: In vivo effect of high energy pulses on rabbit bone. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 21(9), 1219–1225. doi:10.1016/0301-5629(95)00030-5
29. Diederichs, S., & Richter, W. (2017). Induced Pluripotent Stem Cells and Cartilage Regeneration. *Cartilage*, 73–93. doi:10.1007/978-3-319-53316-2_4
30. Djouad, F., Bouffi, C., Ghanam, S., Noël, D., Jorgensen, C. (2009). Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 5(7), 392–399. doi:10.1038/nrrheum.2009.104
31. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent

mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy*, 8(4), 315–317. doi:10.1080/14653240600855905

32. Dudics, V., Kunstár, A., Kovács, J., Lakatos, T., Géher, P., Gömör, B., ... Uher, F. (2009). Chondrogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis: Measurements in a Microculture System. *Cells Tissues Organs*, 189(5), 307–316. doi:10.1159/000140679

33. Egger, C. M., Loe, L., & Doherty, T. (2014). *Pain Management in Veterinary Practice*. United Kingdom: Wiley Blackwell

34. Epstein, M., Rodan, I., Griffenhagen, G., Kadrlik, J., Petty, M., Robertson, S., & Simpson, W. (2015). 2015 AAHA/AAFP Pain Management Guidelines for Dogs and Cats*. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 51(2), 67–84. doi:10.5326/jaaha-ms-7331

35. Eslamian, F., Shakouri, S. K., Ghojzadeh, M., Nobari, O. E., & Eftekharsadat, B. (2011). Effects of low-level laser therapy in combination with physiotherapy in the management of rotator cuff tendinitis. *Lasers in Medical Science*, 27(5), 951–958. doi:10.1007/s10103-011-1001-3

36. Falster, C., Poulsen, S. S., Storaas, A. M., Schroeder, H. M., Vinther, J. H., Kassem, M., & Joergensen, U. (2019). Mesenchymal stem cells isolated from both distal femurs of patients with unilateral trauma or osteoarthritis of the knee exhibit similar in-vitro ability of bone formation. *Journal of Orthopaedic Science*, 24, 918-924. doi:10.1016/j.jos.2019.01.008

37. Felson, D. T. (2000). Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors. *Annals of Internal Medicine*, 133(8), 635. doi:10.7326/0003-4819-133-8-200010170-00016

38. Feng, C., Luo, X., He, N., Xia, H., Lv, X., Zhang, X., ... Wang, W. (2018). Efficacy and Persistence of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Hyaluronic Acid in Osteoarthritis After Intra-articular Injection in a Sheep Model. *Tissue Engineering Part A*, 24(3-4), 219–233. doi:10.1089/ten.tea.2017.0039

39. Formenton, M. R., Pereira, M. A. A., & Fantoni, D. T. (2017). Small Animal Massage Therapy: A Brief Review and Relevant Observations. *Topics in Companion Animal Medicine*, 32(4), 139–145. doi:10.1053/j.tcam.2017.10.001

40. Fortier, L. A., & Travis, A. J. (2011). Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 2(1), 9. doi:10.1186/scrt50

41. Fotouhi, A., Maleki, A., Dolati, S., Aghebati-Maleki, A., & Aghebati-Maleki, L. (2018). Platelet rich plasma, stromal vascular fraction and autologous conditioned serum in treatment of knee osteoarthritis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 104, 652–660. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.019
42. Freitag, J., Bates, D., Boyd, R., Shah, K., Barnard, A., Huguenin, L., & Tenen, A. (2016). Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy – a review. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1). doi:10.1186/s12891-016-1085-9
43. Frost-Christensen, L. N., Mastbergen, S. C., Vianen, M. E., Hartog, A., DeGroot, J., Voorhout, G., ... Hazewinkel, H. A. W. (2008). Degeneration, inflammation, regeneration, and pain/disability in dogs following destabilization or articular cartilage grooving of the stifle joint. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(11), 1327–1335. doi:10.1016/j.joca.2008.03.013
44. Frye, C. W., Shmalberg, J. W., & Wakshlag, J. J. (2016). Obesity, Exercise and Orthopedic Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 46(5), 831–841. doi:10.1016/j.cvsm.2016.04.006
45. Gabel, B. C., Curtis, E. I., Marsala, M., & Ciacci, J. D. (2017). A Review of Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury: Large Animal Models and the Frontier in Humans. *World Neurosurgery*, 98, 438–443. doi:10.1016/j.wneu.2016.11.053
46. Gautam, P., Recino, A., Foale, R. D., Zhao, J., Gan, S. U., Wallberg, M., ... Lever, A. M. L. (2016). Promoter optimisation of lentiviral vectors for efficient insulin gene expression in canine mesenchymal stromal cells: potential surrogate beta cells. *The Journal of Gene Medicine*, 18(10), 312–321. doi:10.1002/jgm.2900
47. Gaynor, J. S. & Muir III, W. W. (2015). *Handbook of Veterinary Pain Management: Third Edition*. United States of America: Elsevier Mosby.
48. Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., & Noël, D. (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(1), 2. doi:10.1186/scrt2
49. Gibbs, N., Diamond, R., Sekyere, E., & Thomas, W. (2015). Management of knee osteoarthritis by combined stromal vascular fraction cell therapy, platelet-rich plasma, and musculoskeletal exercises: a case series. *Journal of Pain Research*, 799. doi:10.2147/jpr.s92090

50. Goldberg, M. E. & Shaffran, N. (2015). *Pain Management for Veterinary Technicians and Nurses*. United States of America: Wiley Blackwell
51. Goldring, M. B. (2000). Osteoarthritis and cartilage: The role of cytokines. *Current Rheumatology Reports*, 2(6), 459–465. doi:10.1007/s11926-000-0021-y
52. Goldring, M. B. (2006). Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 20(5), 1003–1025. doi:10.1016/j.berh.2006.06.003
53. Gonçalves, N., Ambrósio, C., & Piedrahita, J. (2014). Stem Cells and Regenerative Medicine in Domestic and Companion Animals: A Multispecies Perspective. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(Suppl. 4), 2–10. doi:10.1111/rda.12392
54. Götherström, C. (2007). Immunomodulation by Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Transplantation*, 84(1S), S35–S37. doi:10.1097/01.tp.0000269200.67707.c8
55. Guercio, A, Di Bella, S., Casella, S., Di Marco, P., Russo, C., & Piccione, G. (2013). Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biology International*, 37(8), 789–798. doi:10.1002/cbin.10090
56. Guercio, A., Di Marco, P., Casella, S., Cannella, V., Russotto, L., Purpari, G., ... Piccione, G. (2012). Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biology International*, 36(2), 189–194. doi:10.1042/cbi20110304
57. Guermazi, A., Alizai, H., Crema, M. D., Trattnig, S., Regatte, R. R.; Roemer, F. W. (2015). Compositional MRI techniques for evaluation of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 1-15. doi:10.1016/j.joca.2015.05.026
58. Gugjoo, M. B., Amarpal, A., & Sharma, G. T. (2019). Mesenchymal stem cell basic research and applications in dog medicine. *Journal of Cellular Physiology*, 1-33. doi:10.1002/jcp.28348
59. Gugjoo, M. B., Fazili, M. R., Gayas, M. A., Ahmad, R. A., & Dhama, K. (2019). Animal mesenchymal stem cell research in cartilage regenerative medicine – a review. *Veterinary Quarterly*, 1–45. doi:10.1080/01652176.2019.1643051
60. Harman, R., Carlson, K., Gaynor, J., Gustafson, S., Dhupa, S., Clement, K., ... Adams, C. (2016). A Prospective, Randomized, Masked, and Placebo-Controlled Efficacy

Study of Intraarticular Allogeneic Adipose Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(81). doi:10.3389/fvets.2016.00081

61. Hashimoto, S., Ochs, R. L., Komiya, S., & Lotz, M. (1998). Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 41(9), 1632–1638. doi:10.1002/1529-0131(199809)41:9<1632::aid-art14>3.0.co;2-a

62. Haslerud, S., Magnussen, L. H., Joensen, J., Lopes-Martins, R. A. B., & Bjordal, J. M. (2014). The Efficacy of Low-Level Laser Therapy for Shoulder Tendinopathy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Physiotherapy Research International*, 20(2), 108–125. doi:10.1002/pri.1606

63. Haupt, G. (1997). Use of Extracorporeal Shock Waves in the Treatment of Pseudarthrosis, Tendinopathy and Other Orthopedic Diseases. *The Journal of Urology*, 158(1), 4–11. doi:10.1097/00005392-199707000-00003

64. Hawkins, D. H., & Abrahamse, H. (2006). The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(1), 74–83. doi:10.1002/lsm.20271

65. Hellyer, P., Rodan, I., Brunt, J., Downing, R., Hagedorn, J., & Robertson, S. (2007). AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 9(6), 466–480. doi:10.1016/j.jfms.2007.09.001

66. Henderson, A. L., Latimer, C., & Millis, D. L. (2015). Rehabilitation and Physical Therapy for Selected Orthopedic Conditions in Veterinary Patients. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 45(1), 91–121. doi:10.1016/j.cvsm.2014.09.006

67. Hernandez-Avalos, I., Mota-Rojas, D., Mora-Medina, P., Martínez-Burnes, J., Casas Alvarado, A., Verduzco-Mendoza, A., ... Olmos-Hernandez, A. (2019). Review of different methods used for clinical recognition and assessment of pain in dogs and cats. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 7(1), 43–54. doi:10.1080/23144599.2019.1680044

68. Hielm-Bjorkman, A. K., Kuusela, E., Liman, A., Markkola, A., Saarto, E., Huttunen, P., ... Raekallio, M. (2003). Evaluation of methods for assessment of pain associated with chronic osteoarthritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(11), 1552–1558. doi:10.2460/javma.2003.222.1552

69. Hodgkiss-Geere, H. M., Argyle, D. J., Corcoran, B. M., Whitelaw, B., Milne, E., Bennett, D., & Argyle, S. A. (2012). Characterisation and differentiation potential of bone marrow derived canine mesenchymal stem cells. *The Veterinary Journal*, 194(3), 361–368. doi:10.1016/j.tvjl.2012.05.011
70. Holton, L., Pawson, P., Nolan, A., Reid, J., & Scott, E. M. (2001). *Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs. Veterinary Record*, 148(17), 525–531. doi:10.1136/vr.148.17.525
71. Huang, Z., Chen, J., Ma, J., Shen, B., Pei, F., & Kraus, V. B. (2015). Effectiveness of low-level laser therapy in patients with knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23, A384. doi:10.1016/j.joca.2015.02.710
72. Intema, F., DeGroot, J., Elshof, B., Vianen, M. E., Yocum, S., Zuurmond, A., ... Lafeber, F. P. (2008). The canine bilateral groove model of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 26(11), 1471–1477. doi:10.1002/jor.20681
73. Jin, J. (2017). Stem Cell Treatments. *JAMA*, 317(3), 330. doi:10.1001/jama.2016.17822
74. Johnson, K., Zhu, S., Tremblay, M. S., Payette, J. N., Wang, J., Bouchez, L. C., ... Schultz, P. G. (2012). A Stem Cell-Based Approach to Cartilage Repair. *Science*, 336(6082), 717–721. doi:10.1126/science.1215157
75. Johnston, S. A. (1997). Osteoarthritis: joint anatomy, physiology and pathobiology. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 27(4), 699-723. doi:10.1016/s0195-5616(97)50076-3
76. Jorgensen, C. (2013). Mesenchymal stem cells: Uses in osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 80(6), 565–567. doi:10.1016/j.jbspin.2013.08.004
77. Jung, D.I., Ha, J., Kang, B.T., Kim, J.W., Quan, F.S., Lee, J.H., ... Park, H. M. (2009). Uma comparação do transplante autólogo e alogénico de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea em lesão medular canina. *Journal of the Neurological Sciences*, 285 (1-2), 67-77. doi: 10.1016 / j.jns.2009.05.027
78. Kalamegam, G., Memic, A., Budd, E., Abbas, M., & Mobasheri, A. (2018). A Comprehensive Review of Stem Cells for Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi:10.1007/5584_2018_205

79. Kang, B., Ryu, H-H, Park, S. S., Koyama, Y., Kikuchi, M., Woo, H-M, ... Kweon, O-K. (2012). Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of Veterinary Science*, 13(3), 299–. doi:10.4142/jvs.2012.13.3.299
80. Kealy, R. D., Lawler, D. F., Ballam, J. M., Lust, G., Biery, D. N., Smith, G. K., & Mantz, S. L. (2000). Evaluation of the effect of limited food consumption on radiographic evidence of osteoarthritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(11), 1678–1680. doi:10.2460/javma.2000.217.1678
81. Kichenbrand, C., Velot, É., Menu, P., & Moby, V. (2018). Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. doi:10.1089/ten.teb.2018.0168
82. Kilchling, T., & Meyer-Lindenberg, A. (2018). Einsatz mesenchymaler Stammzellen beim Hund. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere*, 46(06), 416–425. doi:10.1055/s-0038-1677407
83. Kim, S. E., Pozzi, A., Yeh, J.-C. , Lopez-Velazquez, M., Yong, J. A. U., Townsend, S., ... Petrucci, K. (2019). Intra-articular umbilical cord derived mesenchymal stem cell therapy for chronic elbow osteoarthritis in dogs: A double-blinded, placebo- controlled clinical trial. *Frontiers in Veterinary Medicine*, 6(474). doi:10.3389/fvets.2019.00474
84. King, M. D. (2017). Etiopathogenesis of Canine Hip Dysplasia, Prevalence, and Genetics. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 47(4), 753–767. doi:10.1016/j.cvsm.2017.03.001
85. Kirkby, K. A., & Lewis, D. D. (2011). Canine Hip Dysplasia: Reviewing the Evidence for Nonsurgical Management. *Veterinary Surgery*, 41(1), 2-9. doi:10.1111/j.1532-950x.2011.00928.
86. Klaumann, P. R., Wouk, A. F. P. F., & Sillas, T. (2008). Patofisiologia da Dor. *Archives of Veterinary Science*, 13(1). doi:10.5380/avs.v13i1.11532
87. Koh, S., & Piedrahita, J. A. (2014). From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: A historical perspective in domestic animals. *Theriogenology*, 81(1), 103–111. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.009
88. Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, 85(1), 3–10. doi:10.1159/000345615

89. Kon, E., Filardo, G., Roffi, A., Andriolo, L., & Marcacci, M. (2012). New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 5(3), 236–243. doi:10.1007/s12178-012-9135-x
90. Kondo, S., Muneta, T., Nakagawa, Y., Koga, H., Watanabe, T., Tsuji, K., ... Sekiya I. (2017). Transplantation of autologous synovial mesenchymal stem cells promotes meniscus regeneration in aged primates. *Journal of Orthopaedic Research*, 35(6), 1274-1282. doi:10.1002/jor.23211
91. Lamont, L. A., Tranquilli, W. J., & Grimm, K. A. (2000). Physiology of pain. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 30(4), 703–728. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(08\)70003-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(08)70003-2)
92. Landa, L. (2012). Pain in domestic animals and how to assess it: A review. *Veterinarni Medicina*, 57(4), 185–192. Retrieved from <https://doi.org/10.17221/5915-VETMED>
93. Laverty, P. H., & McClure, S. R. (2002). Initial experience with extracorporeal shock wave therapy in six dogs – part I. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 15(03), 177–183. doi:10.1055/s-0038-1632734
94. Lee, J., Lee, K. S., Kim, C.-L., Byeon, J. S., Gu, N.-Y., Cho, I.-S., & Cha, S.-H. (2017). Effect of donor age on the proliferation and multipotency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Science*, 18(2), 141. doi:10.4142/jvs.2017.18.2.141
95. Lee, M. I., Kim, J. H., Kwak, H. H., Woo, H. M., Han, J. H., Yayon, A., ... Kang, B. J. (2019). A placebo-controlled study comparing the efficacy of intra-articular injections of hyaluronic acid and a novel hyaluronic acid-platelet-rich plasma conjugate in a canine model of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 14(1). doi:10.1186/s13018-019-1352-1
96. Lee, W., Kim, H. J., Kim, K., Kim, G. B., & Jin, W. (2019). Intra-Articular Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase IIb, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Stem Cells Translational Medicine*, 00(0), 1-8. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1002/sctm.18-0122>
97. Li, N., Gao, J., Mi, L., Zhang, G., Zhang, L., Zhang, N., ... Xu, K. (2020). Synovial membrane mesenchymal stem cells: past life, current situation, and application in bone and joint diseases. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(381). Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01885-3>

98. Loeser, R. F. (2009). Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Research Society International*, 17(8), 971–979. doi:10.1016/j.joca.2009.03.002
99. Looney, A. L., Huntingford, J. L., Blaeser, L. L., & Mann, S. (2018). A randomized blind placebo-controlled trial investigating the effects of photobiomodulation therapy (PBMT) on canine elbow osteoarthritis. *The Canadian Veterinary Journal*, 59(9), 959-966.
100. Luyten, F. P. (2004). Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 16(5), 599–603. doi:10.1097/01.bor.0000130284.64686.63
101. Maldonado, M., & Nam, J. (2013). The Role of Changes in Extracellular Matrix of Cartilage in the Presence of Inflammation on the Pathology of Osteoarthritis. *BioMed Research International*, 1–10. doi:10.1155/2013/284873
102. Mardones, R., Jofré, C. M., Tobar, L., & Minguell, J. J. (2017). Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of hip osteoarthritis. *Journal of Hip Preservation Surgery*, 4(2), 159–163. doi:10.1093/jhps/hnx011
103. Gross, D. M. (2014). Introduction to Therapeutic Lasers in a Rehabilitation Setting. *Topics in Companion Animal Medicine*, 29(2), 49–53. doi:10.1053/j.tcam.2014.09.004
104. Markoski, M. M. (2016). Advances in the Use of Stem Cells in Veterinary Medicine: From Basic Research to Clinical Practice. *Scientifica*, 1–12. doi:10.1155/2016/4516920
105. Marshall, W. G., Hazewinkel, H. A. W., Mullen, D., De Meyer, G., Baert, K., & Carmichael, S. (2010). The effect of weight loss on lameness in obese dogs with osteoarthritis. *Veterinary Research Communications*, 34(3), 241–253. doi:10.1007/s11259-010-9348-7
106. Marx, C., Silveira, M. D., Nardi, N. B. (2015). Adipose-Derived Stem Cells in Veterinary Medicine: Characterization and Therapeutic Applications. *Stem Cells and Development*, 24(7), 803–813. doi:10.1089/scd.2014.0407
107. Marx, C., Silveira, M. D., Selbach, I., da Silva, A. S., Braga, L. M., Camassola, M., ... Nardi, N. B. (2014). Acupoint injection of autologous stromal vascular fraction and allogeneic adipose-derived stem cells to treat hip dysplasia in dogs. *Stem Cells International*, 1-6. doi:10.1155/2014/391274

108. Maryam, S., Jianing, S., & Wilson, S. L. (2019). The efficacy of different sources of mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis. *Cell and Tissue Research*. doi:10.1007/s00441-019-03069-9
109. Matas, L., Orrego, M., Amenabar, D., Infante, C., Tapia-Limonchi, R., Cadiz, M. I., ... Espinoza, F. (2018). Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) for Knee Osteoarthritis: Repeated MSC Dosing Is Superior to a Single MSC Dose and to Hyaluronic Acid in a Controlled Randomized Phase I/II Trial. *STEM CELLS Translational Medicine*, 0(0), 1-10. doi:10.1002/sctm.18-0053
110. Maumus, M., Pers, Y.-M., Ruiz, M., Jorgensen, C., & Noël, D. (2018). Cellules souches mésenchymateuses et médecine régénératrice. *Médecine/sciences*, 34(12), 1092–1099. doi:10.1051/medsci/2018294
111. McGonagle, D., Baboolal, T. G., & Jones, E. (2017). Native joint-resident mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(12), 719–730. doi:10.1038/nrrheum.2017.182
112. Mehranfar, S., Abdi Rad, I., Mostafav, E., & Akbarzadeh, A. (2019). The use of stromal vascular fraction (SVF), platelet-rich plasma (PRP) and stem cells in the treatment of osteoarthritis: an overview of clinical trials. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 882–890. doi:10.1080/21691401.2019.1576710
113. Mei, L., Shen, B., Ling, P., Liu, S., Xue, J., Liu, F., ... Liu, X. (2017). Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model. *PLOS ONE*, 12(4), e0176107–. doi:10.1371/journal.pone.0176107
114. Menon, D. V., Patel, D., Joshi, C. G., & Kumar, A. (2019). The road less travelled: the efficacy of Canine Pluripotent Stem Cells. *Experimental Cell Research*, 377, 94-102. doi:10.1016/j.yexcr.2019.01.025
115. Millis, D. & Levine, D. (2014). *Canine Rehabilitation and Physical Therapy: Second Edition*. United States of America: Elsevier Saunders.
116. Millis, D. L., Francis, D., & Adamson, C. (2005). Emerging Modalities in Veterinary Rehabilitation. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 35(6), 1335–1355. doi:10.1016/j.cvsm.2005.08.007.
117. Mirza, Y. H., & Oussedik, S. (2017). Is there a role for stem cells in treating articular injury? *British Journal of Hospital Medicine*, 78(7), 372–377. doi:10.12968/hmed.2017.78.7.372

118. Mizuno, H., Tobita, M., & Uysal, A. C. (2012). Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *STEM CELLS*, 30(5), 804–810. doi:10.1002/stem.1076
119. Mobasheri, A., Rayman, M. P., Gualillo, O., Sellam, J., van der Kraan, P., & Fearon, U. (2017). The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(5), 302–311. doi:10.1038/nrrheum.2017.50
120. Moore, S. A. (2016). Managing Neuropathic Pain in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 1-8. doi:10.3389/fvets.2016.00012
121. Moser-Kats, L., & Veenman, P. (2008). Veterinary physiotherapy: an introduction to a complementary treatment option. *Veterinary Nursing Journal*, 23(11), 36–37. doi:10.1080/17415349.2008.11013746
122. Mueller, M., Bockstahler, B., Skalicky, M., Mlacnik, E., & Lorinson, D. (2007). Effects of radial shockwave therapy on the limb function of dogs with hip osteoarthritis. *Veterinary Record*, 160(22), 762–765. doi:10.1136/vr.160.22.762
123. Muir, P., Hans, E. C., Racette, M., Volstad, N., Sample, S. J., Heaton, C., ... Hematti, P. (2016). Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Molecular Markers of Inflammation in Dogs with Cruciate Ligament Rupture. *PLOS ONE*, 11(8), e0159095. doi:10.1371/journal.pone.0159095
124. Murata, Y., Uchida, S., Utsunomiya, H., Hatakeyama, A., Nakashima, H., Mori, T., ... Sakai, A. (2020). Differentiation potential of synovial mesenchymal stem cells isolated from hip joints affected by femoroacetabular impingement syndrome versus osteoarthritis. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 36(8), 2122–2133. doi:10.1016/j.arthro.2020.03.016
125. Murphy, J. M., Fink, D. J., Hunziker, E. B., & Barry, F. P. (2003). Stem Cell Therapy in a Caprine Model of Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 48(12), 3464–3474. Doi: 10.1002/art.11365
126. Murphy, N. J., Eyles, J. P., & Hunter, D. J. (2016). Hip Osteoarthritis: Etiopathogenesis and Implications for Management. *Advances in Therapy*, 33(11), 1921–1946. doi:10.1007/s12325-016-0409-3
127. Nganvongpanit, K., Buddhachat, K., & Brown, J. L. (2015). Comparison of Bone Tissue Elements Between Normal and Osteoarthritic Pelvic Bones in Dogs. *Biological Trace Element Research*, 171(2), 344–353. doi:10.1007/s12011-015-0556-4

128. Ogden, J. A., Alvarez, R. G., Levitt, R., & Marlow, M. (2001). Shock Wave Therapy (Orthotripsy ®) in Musculoskeletal Disorders. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 387, 22–40. doi:10.1097/00003086-200106000-00005
129. Okazuka, K., Beard, B. C., Emery, D. W., Schwarzwaelder, K., Spector, M. R., Sale, G. E., ... Blau, C. A. (2011). Long-term Regulation of Genetically Modified Primary Hematopoietic Cells in Dogs. *Molecular Therapy*, 19(7), 1287–1294. doi:10.1038/mt.2011.8
130. Orozco, L., Munar, A., Soler, R., Alberca, M., Soler, F., Huguet, M., ... García-Sancho, J. (2013). Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation Journal*, 95(12), 1535–1541. doi:10.1097/tp.0b013e318291a2da
131. Pak, J. (2011). Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *Journal of Medical Case Reports*, 5(1), 296. doi:10.1186/1752-1947-5-296
132. Park, M. J., Moon, S. J., Baek, J. A., Lee, E. J., Jung, K. A., Kim, E. K., ... Cho, M. L. (2019). Metformin Augments Anti-Inflammatory and Chondroprotective Properties of Mesenchymal Stem Cells in Experimental Osteoarthritis. *The Journal of Immunology*, 203, 127-136. doi:10.4049/jimmunol.1800006
133. Pas, H. I., Winters, M., Haisma, H. J., Koenis, M. J., Tol, J. L., & Moen, M. H. (2017). Stem cell injections in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *British Journal of Sports Medicine*, 51(15), 1125–1133. doi:10.1136/bjsports-2016-096793
134. Perkins, K. M., Spoto, S., Rankin, D. A., Dotson, N. Q., Malarkey, M., Mendoza, M., ... Powell, K. M. (2018). Notes from the Field: Infections After Receipt of Bacterially Contaminated Umbilical Cord Blood–Derived Stem Cell Products for Other Than Hematopoietic or Immunologic Reconstitution — United States, 2018. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 67(50), 1397–1399
135. Pig, J. H., Ishihara, A., Wellman, M. L., Russell, D. S., & Bertone, A. L. (2013). Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 26(06), 453–460. doi:10.3415/vcot-13-01-0008
136. Pinna, S., Lanzi, F., Cordella, A., & Diana, A. (2019). Relationship between the stage of osteoarthritis before and six months after tibial tuberosity advancement procedure in dogs. *PLOS ONE*, 14(8), e0219849. doi:10.1371/journal.pone.0219849

137. Plotnikoff, R., Karunamuni, N., Lytvyak, E., Penfold, C., Schopflocher, D., Imayama, I., ... Raine, K. (2015). Osteoarthritis prevalence and modifiable factors: a population study. *BMC Public Health*, 15(1). doi:10.1186/s12889-015-2529-0
138. Poorpezeshk, N., Ghoreishi, S. K., Bayat, M., Pouriran, R., & Yavari, M. (2018). Early Low-Level Laser Therapy Improves the Passive Range of Motion and Decreases Pain in Patients with Flexor Tendon Injury. *Photomedicine and Laser Surgery*, 36(10), 530–535. doi:10.1089/pho.2018.4458
139. Pryor, B., & Millis, D. L. (2015). Therapeutic Laser in Veterinary Medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 45(1), 45– 56. doi:10.1016/j.cvsm.2014.09.003.
140. Quimby, J. M. (2018). Stem Cell Therapy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. doi:10.1016/j.cvsm.2018.10.001
141. Quinn, M. M., Keuler, N. S., Lu, Y., Faria, M. L. E., Muir, P., & Markel, M. D. (2007). Evaluation of Agreement Between Numerical Rating Scales, Visual Analogue Scoring Scales, and Force Plate Gait Analysis in Dogs. *Veterinary Surgery*, 36(4), 360–367. doi:10.1111/j.1532-950x.2007.00276.x
142. Renberg, W. C. (2005). Pathophysiology and Management of Arthritis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 35(5), 1073–1091. doi:10.1016/j.cvsm.2005.05.005
143. Robinson, W. H., Lepus, C. M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T. M., & Sokolove, J. (2016). Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(10), 580–592. doi:10.1038/nrrheum.2016.136
144. Rodríguez-Jiménez, F. J., Valdes-Sánchez, T., Carrillo, J. M., Rubio, M., Monleon-Prades, M., García-Cruz, D. M., ... Moreno-Manzano, V. (2012). Platelet-Rich Plasma Favors Proliferation of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Methacrylate-Endcapped Caprolactone Porous Scaffold Niches. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(3), 556–568. doi:10.3390/jfb3030556
145. Ruiz, M., Cosenza, S., Maumus, M., Jorgensen, C., & Noël, D. (2015). Therapeutic application of mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16(1), 33–42. doi:10.1517/14712598.2016.1093108
146. Sample, S. J., Racette, M. A., Hans, E. C., Volstad, N. J., Holzman, G., Bleedorn, J. A., ... Muir, P. (2017). Radiographic and magnetic resonance imaging predicts severity of

cruciate ligament fiber damage and synovitis in dogs with cranial cruciate ligament rupture. *PLOS ONE*, 12(6), e0178086. doi:10.1371/journal.pone.0178086

147. Sandell, L. J. (2012). Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(2), 77–89. doi:10.1038/nrrheum.2011.199

148. Sasaki, A., Mizuno, M., Ozeki, N., Katano, H., Otabe, K., Tsuji, K., ... Sekiya, I. (2018). Canine mesenchymal stem cells from synovium have a higher chondrogenic potential than those from infrapatellar fat pad, adipose tissue, and bone marrow. *PLOS ONE*, 13(8), e0202922. doi:10.1371/journal.pone.0202922

149. Schaden, W., Fischer, A., & Sailer, A. (2001). Extracorporeal Shock Wave Therapy of Nonunion or Delayed Osseous Union. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 387, 90–94. doi:10.1097/00003086-200106000-00012

150. Sems, A., Dimeff, R., & Iannotti, J. P. (2006). Extracorporeal shock wave therapy in the treatment of chronic tendinopathies. *Journal of American Academy Orthopaedic Surgeons*, 14(4), 195–204

151. Shah, K., Drury, T., Roic, I., Hansen, P., Malin, M., Boyd, R., ... Ferguson, R. (2018). Resultado da terapia alogénica com células-tronco adultas em cães que sofrem de osteoartrite e outros defeitos nas articulações. *Stem Cells International*, 1-7. doi: 10.1155 / 2018/7309201

152. Sharma, A., Jagga, S., Lee, S.-S., & Nam, J.-S. (2013). Interplay between Cartilage and Subchondral Bone Contributing to Pathogenesis of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19805–19830. doi:10.3390/ijms141019805

153. Sherwood, J. M., Roush, J. K., Armbrust, L. J., & Renberg, W. C. (2017). Prospective Evaluation of Intra-Articular Dextrose Prolotherapy for Treatment of Osteoarthritis in Dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 53(3), 135–142. doi:10.5326/jaaha-ms-6508

154. Silvério, K. G., Benatti, B. B., Casati, M. Z., Sallum, E. A., & Nociti, F. H. (2008). Stem Cells: Potential Therapeutics for Periodontal Regeneration. *Stem Cell Reviews*, 4(1), 13–19. doi:10.1007/s12015-008-9011-7

155. Sneddon, L. U., Elwood, R. W., Adamo, S. A., & Leach, M. C. (2014). Defining and assessing animal pain. *Animal Behaviour*, 97, 201–212. doi:10.1016/j.anbehav.2014.09.007

156. Song, Y., Du, H., Dai, C., Zhang, L., Li, S., Hunter, D. J., ... Bao, C. (2018). Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regenerative Medicine*, rme-2017-0152–. doi:10.2217/rme-2017-0152
157. Sousa, I. S. (2017). Modalidades Terapêuticas Em Reabilitação Funcional De Pequenos Animais (Master's thesis, Universidade do Porto). Retrieved from <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/106824>.
158. Souza, A. N. A., Ferreira, M. P., Hagen, S. C. F., Patrício, G. C. F., & Matera, J. M. (2016). Radial shock wave therapy in dogs with hip osteoarthritis. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 29(2), 108–114. doi:10.3415/vcot-15-01-0017
159. Sullivan, M. O., Gordon-Evans, W. J., Knap, K. E., & Evans, R. B. (2013). Randomized, Controlled Clinical Trial Evaluating the Efficacy of Pulsed Signal Therapy in Dogs with Osteoarthritis. *Veterinary Surgery*, 42(3), 250–254. doi:10.1111/j.1532-950x.2012.01066.x
160. Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., ... Mobasheri, A. (2009). The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, 179(1), 10–24. doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.013
161. Takemitsu, H., Zhao, D., Yamamoto, I., Harada, Y., Michishita, M., & Arai, T. (2012). Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 150. doi:10.1186/1746-6148-8-150
162. Tao, S-C., Yuan, T., Zhang, Y-L., Yin, W-J., Guo, S-C., Zhang, C-Q. (2017). Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics*, 7(1), 180–195. doi:10.7150/thno.17133
163. Tellegen, A. R., Dessing, A. J., Houben, K., Riemers, F. M., Creemers, L. B., Mastbergen, S. C., ... Tryfonidou, M. A. (2019). The dog as a model for osteoarthritis: the FGF4 retrogene insertion may matter. *Journal of Orthopaedic Research*. doi:10.1002/jor.24432
164. Ter Huurne, M., Schelbergen, R., Blattes, R., Blom, A., de Munter, W., Grevers, L. C., ... van Lent, P. L. E. M. (2012). Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 64(11), 3604–3613. doi:10.1002/art.34626

165. Thiel, M. (2001). Application of Shock Waves in Medicine. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 387, 18–21. doi:10.1097/00003086-200106000-00004
166. Trounson, A., & McDonald, C. (2015). Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*, 17(1), 11–22. doi:10.1016/j.stem.2015.06.007
167. Venkatalaxmi, A., Padmavathi, B.S., Amaranath, T. (2004). A general solution of unsteady Stokes equations. *Fluid Dynamics Research*, 35(1), 229-236. doi:10.1016/j
168. Venzin, C., Ohlerth, S., Koch, D., & Spreng, D. (2004). Extracorporeal shockwave therapy in a dog with chronic bicipital tenosynovitis. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 146(3), 136–141. doi: 10.1024/0036-7281.146.3.136
169. Vilar, J. M., Batista, M., Morales, M., Santana, A., Cuervo, B., Rubio, M., ... Carrillo, J. M. (2014). Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 143. doi:10.1186/1746-6148-10-143
170. Vilar, J. M., Cuervo, B., Rubio, M., Sopena, J., Domínguez, J. M., Santana, A., & Carrillo, J. M. (2016). Effect of intraarticular inoculation of mesenchymal stem cells in dogs with hip osteoarthritis by means of objective force platform gait analysis: concordance with numeric subjective scoring scales. *BMC Veterinary Research*, 12(1). doi:10.1186/s12917-016-0852-z
171. Vilar, J. M., Morales, M., Santana, A., Spinella, G., Rubio, M., Cuervo, B., ... Carrillo, J. M. (2013). Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 131. doi:10.1186/1746-6148-9-131
172. Vinatier, C., & Guicheux, J. (2016). Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 59(3), 139–144. doi:10.1016/j.rehab.2016.03.002
173. Vogel, P. L. (2012). Surgeon's use of adipose stem cell therapy [abstract]. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 3(1), 10.
174. Volk, S. W., & Theoret, C. (2013). Translating stem cell therapies: The role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair and Regeneration*, 21(3), 382–394. doi:10.1111/wrr.12044
175. Volk, S. W., Wang, Y., & Hankenson, K. D. (2012). Effects of Donor Characteristics and Ex Vivo Expansion on Canine Mesenchymal Stem Cell Properties:

Implications for MSC-Based Therapies. *Cell Transplantation*, 21(10), 2189–2200. doi:10.3727/096368912x636821

176. Wang, C.-J., Wang, F.-S., Yang, K. D., Weng, L.-H., Hsu, C.-C., Huang, C.-S., & Yang, L.-C. (2003). Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon–bone junction. A study in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research*, 21(6), 984– 989. doi:10.1016/s0736-0266(03)00104-9

177. Wang, Y., Yu, D., Liu, Z., Zhou, F., Dai, J., Wu, B., ... Liu, H. (2017). Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1). doi:10.1186/s13287-017-0632-0

178. Woolf, C. J. (2004). Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Annals of Internal Medicine*, 140(6), 441. doi:10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00010

179. Woolf, C. J., & Ma, Q. (2007). Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron*, 55(3), 353–364. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.016

180. Wyszynska, J., & Bal-Bocheńska, M. (2018). Efficacy of High-Intensity Laser Therapy in Treating Knee Osteoarthritis: A First Systematic Review. *Photomedicine and Laser Surgery*, 36(7), 343–353. doi:10.1089/pho.2017.4425

181. Yamada, Y., Ueda, M., Hibi, H., & Nagasaka, T. (2004). Translational Research for Injectable Tissue-Engineered Bone Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: From Basic Research to Clinical Case Study. *Cell Transplantation*, 13, 343-355

182. Yaneselli, K. M., Kuhl, C. P., Terraciano, P. B., de Oliveira, F. S., Pizzato, S. B., Pazza, K., ... Maisonnave, J. (2018). Comparison of the characteristics of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells extracted from different sites and at different passage numbers. *Journal of Veterinary Science*, 19(1), 13–. doi:10.4142/jvs.2018.19.1.13

183. Youssef, E. F., Muaidi, Q. I., & Shanb, A. A. (2016). Effect of Laser Therapy on Chronic Osteoarthritis of the Knee in Older Subjects. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 7(2), 112–119. doi:10.15171/jlms.2016.19

184. Zeira, O., Scaccia, S., Pettinari, L., Ghezzi, E., Asiag, N., Martinelli, L., ... Aralla, M. (2018). Intra-Articular Administration of Autologous Micro-Fragmented Adipose Tissue in Dogs with Spontaneous Osteoarthritis: Safety, Feasibility, and Clinical Outcomes. *STEM CELLS Translational Medicine*. doi:10.1002/sctm.18-0020

185. Zellner, J., Pattappa, G., Koch, M., Lang, S., Weber, J., Pfeifer, C. G.; ... Angele, P. (2017). Autologous mesenchymal stem cells or meniscal cells: what is the best cell source for regenerative meniscus treatment in an early osteoarthritis situation?. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 225. doi:10.1186/s13287-017-0678-z
186. Zhao, X., Ruan, J., Tang, H., Li, J., Shi, Y., Li, M., ... Dai, C. (2019). Multi-compositional MRI evaluation of repair cartilage in knee osteoarthritis with treatment of allogeneic human adiposederived mesenchymal progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 308. doi:10.1186/s13287-019-1406-7
187. Zhu, Y., Wang, Y., Zhao, B., Niu, X., Hu, B., Li, Q., ... Wang, Y. (2017). Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 64. doi:10.1186/s13287-017-0510-9
188. Zucconi, E., Vieira, N. M., Bueno, D. F., Secco, M., Jazedje, T., Ambrosio, C. E., ... Zatz, M. (2010). Mesenchymal Stem Cells Derived From Canine Umbilical Cord Vein—A Novel Source for Cell Therapy Studies. *Stem Cells and Development*, 19(3), 395–402. doi:10.1089/scd.2008.0314

Anexos

Anexo 1: Sistemas De Classificação Desenvolvidos Para Osteoartrite Canina

Grau 0	Normal
Grau I	Estreitamento do espaço articular duvidoso e possível osteófitos na borda
Grau II	Possível estreitamento do espaço articular e osteófito definido
Grau III	Definido estreitamento do espaço articular, múltiplos osteófitos moderados, alguma esclerose subcondral e possível deformidade do contorno ósseo
Grau IV	Notável estreitamento do espaço articular, severa esclerose subcondral, definida deformidade do contorno ósseo e presença de grandes osteófitos

Figura 25: Classificação radiológica de osteoartrite de Keellgreen e Lawrence.

Tabela 12: Classificação de Osteoartrite, segundo Kellgren e Lawrence (Adaptado de Shah et al., 2018).

Grau de OA	Características Radiográficas	OA
0	Sem alterações	Sem evidência de OA
1	Osteófitos diminutos	Duvidoso
2	Osteófitos definidos	Mínimo
3	Espaço articular diminuído	Moderado
4	Espaço articular muito reduzido + esclerose do osso subcondral + osteófitos	Evidente

Anexo 2: Escalas De Dor Em Cães

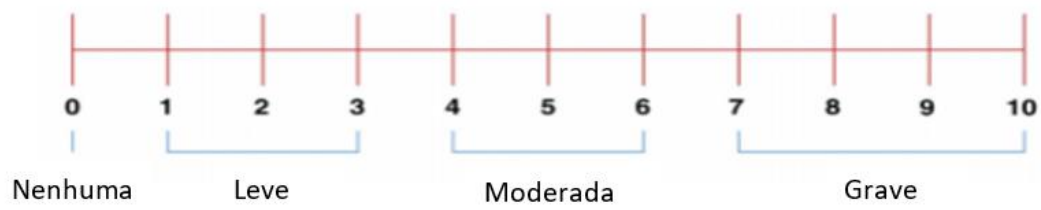


Figura 26: Escala Visual Analógica (VAS) (Adaptado de Gaynor & Muir, 2015).

BOX 5-4 University of Melbourne Pain Scale (UMPS)		
CATEGORY	DESCRIPTOR	SCORE
1. Physiologic data		
a.	Physiologic data within reference range	0
b.	Dilated pupils	2
c. Choose only one	Percentage increase in heart rate relative to preprocedural rate	
	> 20%	1
	> 50%	2
	> 100%	3
d. Choose only one	Percentage increase in respiratory rate relative to preprocedural rate	
	> 20%	1
	> 50%	2
	> 100%	3
e.	Rectal temperature exceeds reference range	1
f.	Salivation	2
2. Response to palpation (choose only one)	No change from preprocedural behavior	0
	Guards/reacts* when touched	2
	Guards/reacts* before touched	3
3. Activity (choose only one)	At rest: sleeping	0
	At rest: semiconscious	0
	At rest: awake	1
	Eating	0
	Restless (pacing continuously, getting up and down)	2
	Rolling, thrashing	3
4. Mental status (choose only one)	Submissive	0
	Overtly friendly	1
	Wary	2
	Aggressive	3
5. Posture		
a.	Guarding or protecting affected area (includes fetal position)	2
b. Choose only one	Lateral recumbency	0
	Sternal recumbency	1
	Sitting or standing, head up	1
	Standing, head hanging down	2
	Moving	1
	Abnormal posture (e.g., prayer position or hunched back)	2
6. Vocalization† (choose only one)	Not vocalizing	0
	Vocalizing when touched	2
	Intermittent vocalization	2
	Continuous vocalization	3

Figura 27: Escala de Dor da Universidade de Melbourne (Adaptada de Gaynor & Muir, 2015).

BOX 5-5

Short Form of the Glasgow Composite Measure Pain Scale

Dog's name _____

Date / / Time

Hospital Number _____

Procedure or Condition _____

In the sections below please circle the appropriate score in each list and sum these to give the total score.

A. Look at dog in Kennel

Is the dog

(i)

Quiet

0

Crying or whimpering

1

Groaning

2

Screaming

3

(ii)

Ignoring any wound or painful area

0

Looking at wound or painful area

1

Licking wound or painful area

2

Rubbing wound or painful area

3

Chewing wound or painful area

4

In the case of spinal, pelvic or multiple limb fractures, or where assistance is required to aid locomotion do not carry out section B and proceed to C.
Please tick if this is the case ☐ then proceed to C.

B. Put lead on dog and lead out of the kennel

When the dog rises/walks is it?

(iii)

Normal

0

Lame

1

Slow or reluctant

2

Stiff

3

It refuses to move

4

C. If it has a wound or painful area including abdomen, apply gentle pressure 2 inches round the site

Does it?

(iv)

Do nothing

0

Look round

1

Flinch

2

Growl or guard area

3

Snap

4

Cry

5

D. Overall

Is the dog?

(v)

Happy and content or happy and bouncy

0

Quiet

1

Indifferent or non-responsive to surroundings

2

Nervous or anxious or fearful

3

Depressed or non-responsive to stimulation

4

Is the dog?

(vi)

Comfortable

0

Unsettled

1

Restless

2

Hunched or tense

3

Rigid

4

Total Score (i+ii+iii+iv+v+vi) = _____

Figura 28: Escala composta de dor de Glasgow – Forma abreviada (Adaptada de Gaynor & Muir, 2015).



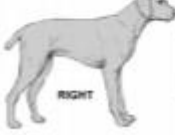
Colorado State University
Veterinary Medical Center
Canine Acute Pain Scale

Date _____
Time _____

Reassess when awake

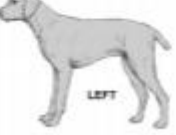
☐ Animal is sleeping, but can be aroused - Not evaluated for pain
☐ Animal can't be aroused, check vital signs, assess therapy

Pain Score	Example	Psychological & Behavioral	Response to Palpation	Body Tension
0		☐ Comfortable when resting ☐ Happy, content ☐ Not bothering wound or surgery site ☐ Interested in or curious about surroundings	☐ Nontender to palpation of wound or surgery site, or to palpation elsewhere	Minimal
1		☐ Content to slightly unsettled or restless ☐ Distracted easily by surroundings	☐ Reacts to palpation of wound, surgery site, or other body part by looking around, flinching, or whimpering	Mild
2		☐ Looks uncomfortable when resting ☐ May whimper or cry and may lick or rub wound or surgery site when unattended ☐ Droopy ears, worried facial expression (arched eye brows, staring eyes) ☐ Reluctant to respond when beckoned ☐ Not eager to interact with people or surroundings but will look around to see what is going on	☐ Flinches, whimpers cries, or guards/pulls away	Mild to Moderate Reassess analgesic plan
3		☐ Unsettled, crying, growling, biting or chewing wound when unattended ☐ Guards or protects wound or surgery site by altering weight distribution (i.e., limping, shifting body position) ☐ May be unwilling to move all or part of body	☐ May be subtle (shifting eyes or increased respiratory rate) if dog is too painful to move or is stoic ☐ May be dramatic, such as a sharp cry, growl, bite or bite threat, and/or pulling away	Moderate Reassess analgesic plan
4		☐ Constantly growling or screaming when unattended ☐ May bite or chew at wound, but unlikely to move ☐ Potentially unresponsive to surroundings ☐ Difficult to distract from pain	☐ Cries at non-painful palpation (may be experiencing allodynia, wind-up, or fearful that pain could be made worse) ☐ May react aggressively to palpation	Moderate to Severe May be right to avoid painful movement Reassess analgesic plan



RIGHT

☐ Tender to palpation
☒ Warm
☒ Tense



LEFT

Comments _____

Figura 29: Escala de Dor da Universidade de Colorado – para dor aguda (Gaynor & Muir, 2015).



Colorado State University
Veterinary Medical Center
Canine Chronic Pain Scale

Date _____

Time _____

Many signs of chronic pain are non-specific; rule out anxiety, poor general health, and systemic disease as part of a full workup.

Pain Score	Example	Psychological & Behavioral	Postural	Response to Palpation
0		☐ Happy, energetic ☐ Interested in or curious about surroundings ☐ Responsive; seeks attention	☐ Comfortable when resting ☐ Stands and walks normally ☐ Normal weight bearing on all limbs	☐ Minimal body tension ☐ Does not mind touch ☐ No reaction to palpation of joint
1		☐ Subdued to slightly unsettled or restless ☐ Distracted easily by surroundings ☐ Responsive; may not initiate interaction	☐ Stands normally, may occasionally shift weight ☐ Slight lameness when walking	☐ Mild body tension ☐ Does not mind touch except painful area ☐ Turns head in recognition of joint palpation
2		☐ Anxious, uncomfortable ☐ Not eager to interact with people or surroundings but will look around to see what is going on ☐ Loss of brightness in eyes ☐ Reluctant to respond when beckoned	☐ Abnormal weight distribution when standing ☐ Moderate lameness when walking ☐ May be uncomfortable at rest	☐ Mild to moderate body tension ☐ Doesn't mind touch far away from painful area ☐ Pulls limb away during palpation of affected joint Reassess analgesic plan
3		☐ Fearful, agitated, or aggressive ☐ Avoids interaction with people and surroundings ☐ May lick or otherwise attend to painful area	☐ Abnormal posture when standing ☐ Does not bear weight on affected limb when walking ☐ Guards painful area by shifting body position	☐ Moderate body tension ☐ Tolerates touch far away from affected limb ☐ Vocalizes or responds aggressively to palpation of affected joint Reassess analgesic plan
4		☐ Depressed, depressed ☐ Potentially unresponsive to surroundings ☐ Difficult to distract from pain	☐ Reluctant to rise and will not walk more than 5 strides ☐ Does not bear weight on limb ☐ Appears uncomfortable at rest	☐ Moderate to severe body tension ☐ Chafes or barely tolerates any touch (may be experiencing allodynia, wind-up, or fearful that pain could be made worse) ☐ Will not allow palpation of joint Reassess analgesic plan

Additional Comments:

Figura 30: Escala de Dor da Universidade de Colorado – para dor Crónica (Gaynor & Muir, 2015).

Today's Date: / /

Patient/Study ID# _____

Canine Brief Pain Inventory (CBPI)

Description of Pain:

Rate your dog's pain.

1. Fill in the oval next to the one number that best describes the pain at its **worst** in the last 7 days.
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
No Pain Extreme Pain

2. Fill in the oval next to the one number that best describes the pain at its **least** in the last 7 days.
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
No Pain Extreme Pain

3. Fill in the oval next to the one number that best describes the pain at its **average** in the last 7 days.
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
No Pain Extreme Pain

4. Fill in the oval next to the one number that best describes the pain as it is **right now**.
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
No Pain Extreme Pain

Description of Function:

Fill in the oval next to the one number that describes how during the past 7 days **pain has interfered** with your dog's:

5. General Activity
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Does not Interfere Completely Interferes

6. Enjoyment of Life
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Does not Interfere Completely Interferes

Today's Date: / /

Patient/Study ID# _____

Description of Function (continued):

Fill in the oval next to the one number that describes how during the past 7 days **pain has interfered** with your dog's:

7. Ability to Rise to Standing From Lying Down
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Does not Interfere Completely Interferes

8. Ability to Walk
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Does not Interfere Completely Interferes

9. Ability to Run
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Does not Interfere Completely Interferes

10. Ability to Climb Up (for example Stairs or Curbs)
☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10
Does not Interfere Completely Interferes

Overall Impression:

11. Fill in the oval next to the one response best describes your dog's overall quality of life over the last 7 days?
☐ Poor ☐ Fair ☐ Good ☐ Very Good ☐ Excellent

Figura 31: Canine Brief Pain Index (Adaptada de Gaynor & Muir, 2015).

Anexo 3: Sistemas De Pontuação Do Grau De Claudicação

Box 10-1

Lameness Score (Applied Separately at a Walk and a Trot)

0: Normal

1: Slight, intermittent lameness

2: Obvious weight-bearing lameness

3: Severe weight-bearing lameness

4: Intermittent non-weight-bearing lameness

5: Continuous non-weight-bearing lameness

Figura 32: Pontuação de grau de claudicação (Millis & Levine, 2014).

	Degree of lameness (stance)	Degree of lameness (walk)	Degree of lameness (trot)
Orthopedic lameness	0 = Normal stance	0 = No lameness/weight-bearing on all strides observed	0 = No lameness/weight-bearing on all strides observed
	1 = Slightly abnormal stance (partial weight-bearing)	1 = Mild subtle lameness with partial weight-bearing	1 = Mild subtle lameness with partial weight-bearing
	2 = Moderately abnormal stance (toe-touch weight-bearing)	2 = Obvious lameness with partial weight-bearing	2 = Obvious lameness with partial weight-bearing
	3 = Severely abnormal stance (holds limb off the floor)	3 = Obvious lameness with intermittent weight-bearing	3 = Obvious lameness with intermittent weight-bearing
	4 = Unable to stand	4 = Full non-weight-bearing lame	4 = Full non-weight-bearing lame

Figura 33: Sistema de pontuação de grau de claudicação: em estação, passo e trote (Millis & Levine, 2014).

VII

Anexo 4: Tabelas Comparativas Entre As Diversas Escalas

Escala que avalia apenas uma característica (comportamento ou constantes fisiológicas).

Tabela 13: Escalas subjetivas ou unidimensionais.

SDS (Hjelm-Biorkman <i>et al.</i> , 2003; Hernandez-Avalos <i>et al.</i> , 2019)	NRS (Hernandez-Avalos <i>et al.</i> , 2019; Quinn <i>et al.</i> , 2007; Vilar <i>et al.</i> , 2016)	VAS (Hjelm-Biorkman <i>et al.</i> , 2003; Marshall <i>et al.</i> , 2010; Vilar <i>et al.</i> , 2016; Hernandez-Avalos <i>et al.</i> , 2019).
Predefine categorias e atribui um valor a cada uma delas;	Linha horizontal dividida em 10 segmentos	Escala gráfica que utiliza uma linha horizontal de 100 milímetros (mm) de comprimento
0: sem dor; 1: nível médio; 2: nível moderado e 3: nível grave	0: ausência de dor 10: a pior dor	0 mm: sem dor 100 mm: dor máxima
Desvantagem: Baixa sensibilidade na detecção de pequenas variações	Vantagem: considera diversas variáveis	Faz-se marcação na linha

Escala que considera o comportamento e as constantes fisiológicas.

Tabela 14: Escalas objetivas ou multidimensionais - escalas de dor aguda.

Escala composta de medição da dor de Glasgow (Holton, Pawson, Nolan, Reid, & Scott, 2011; Hernandez-Avalos <i>et al.</i> , 2019)	Escala de Dor da Universidade de Melbourne (Hernandez-Avalos <i>et al.</i> , 2019)	Escala de Dor da Universidade de Colorado (Hernandez-Avalos <i>et al.</i> , 2019)
Baseada no comportamento	Atribui-se um valor para cada variável	Escala identifica o nível de dor, baseando-se na postura do animal
Inclui um questionário estruturado com sete categorias	Escala considera seis variáveis	Escala representa três componentes: psicológico / comportamental, resposta à palpação e tensão corporal
Pontuação de 0 a 24 (se houver mobilidade)	Pontuação: 1 - 5 pontos: leve; 6 – 13: moderada; 14 – 21: grave;	Pontuação de 0 a 4 em cada componente: 0: menor dor;

Pontuação de 0 a 20 (se não houver mobilidade)	22 – 27: insuportável	4: maior dor
Analgesia de resgate se pontuação ≥ 6 (com mobilidade) ou ≥ 5 (sem mobilidade)		Disponível para categorizar a dor aguda e a crónica

Tabela 15: Escalas objetivas ou multidimensionais - escalas de dor crónica.

Índice de dor em cães (Gaynor & Muir, 2015)	HCPI (Goldberg & Shaffran, 2015)	CODI (Goldberg & Shaffran, 2015)	Instrumento de osteoartrite em cães de Liverpool (Epstein, 2013; Goldberg & Shaffran, 2015)	Escala de Dor da Universidade de Colorado (Hernandez-Avalos <i>et al.</i> , 2019)
Questionário aplicado pelo tutor	Tutores descrevem o comportamento dos seus animais	Realização de uma lista de cinco atividades prejudicadas	Tutores avaliam a mobilidade do seu cão em 13 áreas (5 domínios gerais e 8 domínios de exercícios)	Escala identifica o nível de dor, baseando-se na postura do animal
Quantifica a gravidade e o impacto da dor crónica	Índice que utiliza a soma de 11 itens pontuados individualmente tendo em conta uma escala de 0 a 4	Lista realizada pelo tutor e adequada ao seu cão	Avaliação em uma escala descritiva simples de 0 a 4	Escala representa três componentes: psicológico / comportamental, resposta à palpação e tensão corporal
Média da resposta para quatro perguntas	Média do índice ao longo de uma semana pode permitir resultados mais confiáveis	Posterior pontuação descritiva tendo em conta a		Pontuação de 0 a 4 em cada componente: 0: menor dor; 4: maior dor

pontuadas de 0 a 10		dificuldade em cada atividade		
Interferência da dor do animal com sua função diária medida e pela média da pontuação de seis questões em escala de 0 a 10				Disponível para categorizar a dor aguda e a crónica

Anexo 5: Células Estaminais Hematopoiéticas, Neurais E Fetais Do Cordão Umbilical

Tabela 16: Descrição das características e funcionalidades das células estaminais com potencial terapêutico que não são o foco da dissertação.

EH (Bragança <i>et al.</i> , 2010; Okazuka <i>et al.</i> , 2011; Kolios, & Moodley, 2013)	EN (Silvério, Benatti, Casati, Sallum, & Nocito, 2008; Bragança <i>et al.</i> , 2010; Trounson & McDonald, 2015)	ECU (Bragança <i>et al.</i> , 2010)
Células oligopotententes: podem diferenciar-se em linhagens mielóide e linfoide	Células multipotententes: podem dar origem a neurónios, oligodendrócitos e astrócitos	_____
Localizam-se sobretudo na medula óssea e no sangue periférico	Também já foram encontradas na polpa dentária, tecidos que rodeiam e suportam os dentes e na mucosa olfativa	Consoante a sua proveniência, têm o potencial de se diferenciar em células da linhagem

		hematopoiética e mesenquimal
Distinguem-se pela sua capacidade de autorrenovação e diferenciação em várias linhagens sanguíneas	Derivadas do sistema nervoso	Possuem grande plasticidade
Também participam na regeneração de tecidos periféricos, promovendo o sistema imunológico	Capazes de se autorrenovar	Utilizadas no tratamento de doenças malignas (leucemias, linfomas, tumores sólidos) e não malignas (deficiências metabólicas hereditárias, anemias e imunodeficiências)
Humanos - usadas para: - transplante alogénico; - doenças imunes hereditárias ou adquiridas (anemia de <i>Fanconi</i> , anemia aplástica grave); - doenças hematológicas malignas (leucemias mielóides e linfóides, linfomas)	Usadas para reparar o SNC danificado, incluindo lesões cerebrais e da medula espinhal sobretudo em medicina humana	O seu potencial terapêutico foi também confirmado em modelos animais de diabetes, doenças cardíacas como enfarte do miocárdio e doenças cerebrovasculares e neuronais como acidente vascular cerebral (AVC) e doença de <i>Alzheimer</i>

Anexo 6: Diferenças Celulares

Tabela 17: Diferenças entre células autólogas e células alogénicas.

Células Autólogas	Células Alogénicas
Isolamento de células de tecidos como gordura ou medula óssea, principalmente (Takemitsu, 2012)	Isolamento de células de grande parte dos tecidos

Expandidas e administradas no mesmo animal (Vilar <i>et al.</i> , 2014)	Permitido o uso de MSCs expandidas por cultura, colhidas de um único dador, para tratar vários animais (Volk, Wang, & Hankenson, 2012)
Sobrevivem por mais tempo no corpo (Quimby, 2018)	Sobrevivem por menos tempo no corpo (Quimby, 2018)
Não evita submissão do animal ao procedimento de colheita (Quimby, 2018)	Evita submissão do animal ao procedimento de colheita (Quimby, 2018)
Não permite a utilização de MSCs de animais dadores 100% saudáveis (Quimby, 2018)	Permite a utilização de MSCs de animais dadores saudáveis (Quimby, 2018)
Podem induzir respostas imunes adversas	Não induzem respostas imunes adversas e podem ter uma melhor potência, quando colhido de certas fontes como sangue do cordão umbilical (Gabel, Curtis, Marsala, & Ciacchi, 2017)
Piores em termos económicos e de facilidade de uso (Mehranfar <i>et al.</i> , 2019)	Melhores em termos económicos e de facilidade de uso (Mehranfar <i>et al.</i> , 2019)
A morbilidade do local dador para colher MSCs autólogas é um ponto negativo. Além disso, se as células forem manipuladas após a remoção, há o risco da sua contaminação (Lee <i>et al.</i> , 2019)	Risco, embora baixo, de rejeição imunológica, possibilidade de formação de tumores e possível transmissão de doenças (Gabel <i>et al.</i> , 2017; Lee <i>et al.</i> 2019)

Anexo 7: Aprovação Pela Comissão De Ética Da Universidade Lusófona De Humanidades E Tecnologias (ULHT).



Anexo 4 - Apreciação da CEBEA-ULHT

Lisboa, 18 de Novembro de 2021

Exma. Ângela Martins,

A Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, vem por este meio informar, que o projecto intitulado "Terapêutica de células estaminais na osteoartrite grave em cães", com o processo nº 107-2021 foi considerado aprovado.

Esta aprovação é válida por um ano e pode ser usada para efeitos de publicação. Caso o projecto tenha uma duração superior a um ano, deverá ser requisitada renovação à CEBEA-ULHT.

Assinado por : RUI PEDRO BRÁS MARTINS FAÍSCA
Num. de Identificação: 10742985
Data: 2021.11.18 19:42:43+00'00'

 CARTÃO DE CIDADÃO
RUI PEDRO FAÍSCA
Coordenador CEBEA-ULHT

Assinado por : Raquel Estêvão de Matos
Num. de Identificação: 8112115694
Data: 2021.11.18 16:27:19+00'00'

Raquel Estêvão de Matos
Secretária CEBEA-ULHT

Figura 34: Documento de aprovação pela comissão de ética da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT).

Anexo 8: Termo De Consentimento Dos Tutores.



Termo de consentimento

Tutor Nome: Número de identificação:
Nome do Animal:
Raça:
Idade:
Espécie: ☐ Gato ☐ Cão ☐ Outro
Género: ☐ Masculino ☐ Feminino

Eu, _____, tutor do doente acima descrito ou legalmente responsável pelo mesmo, autorizo a administração de células estaminais no âmbito de medicina regenerativa, segundo protocolo prescrito pelo médico veterinário.

Declaro ter sido informado, de forma clara e objetiva, de todo o procedimento inerente, possíveis reações adversas e efeitos secundários, nomeadamente reação anafilática.

Comprometo-me, ainda, ao pagamento prévio das células estaminais, de forma a permitir a sua encomenda e preparação*.

Desta forma, assino o presente termo de consentimento, de acordo com o meu documento de identificação.

_____/_____/_____

O Tutor

Figura 35: Documento representativo do consentimento dos tutores.

Anexo 9: Grau De Osteofitose

Tabela 18: Classificação do grau de osteofitose (Adaptado de Murphy et al., 2003).

Presença de osteófitos	
0	Nenhuma (ou ausência de osteófitos)
1	Cartilagem/tecido conjuntivo (ou possível presença de osteófitos)
2	Maioritariamente cartilagem/Alguma formação óssea (ou presença de osteófitos)
3	Maioritariamente formação óssea (ou presença de osteófitos graves)

Anexo 10: Escala De Condição Corporal.



Anexo 11: Exemplo De Análise Microbiológico Das Células Estaminais



RN (N)
Pág. 1/1

VAL. REF.
HISTÓRICO

MICROBIOLOGIA

Hemocultura, Exame Microbiológico

Localização:

Ex. Cultural

Resultado:

Observações:

Meio de cultura

Negativo em Aerobiose e Anaerobiose

Negativo para fungos aos 5 dias de incubação.

Figura 37: Exemplo de análise microbiológico das células estaminais.

Anexo 12: Tabelas De Identificação Dos Casos

Tabela 19: Tabela dos casos com variáveis categorizadas.

ID do Animal	Idade	Peso Vivo	Condição Corporal (1 a 9)	Gênero	Raça	Localização da Lesão
1	1	1	1	1	1	1
2	0	0	0	1	1	0
3	0	1	1	0	1	0
4	1	0	0	1	0	1
5	1	0	0	1	0	0
6	1	0	0	1	1	0
7	1	1	1	1	1	0
8	0	1	1	0	1	0

Tabela 20: Legenda da categorização da variável “Idade”.

Idade (anos)	
≤ 7	0
> 7	1

Tabela 21: Legenda da categorização da variável “Peso Vivo”.

Peso Vivo (kg)	
≤ 35	0
> 35	1

Tabela 22: Legenda da categorização da variável “Condição Corporal”.

Condição Corporal	
≤ 3	0
> 3	1

Tabela 23: Legenda da categorização da variável “Género”.

Género	
Masculino	0
Feminino	1

Tabela 24: Legenda da categorização da variável “Raça”.

Raça	
Sem Raça Definida	0
Com Raça Definida	1

Tabela 25: Legenda da categorização da variável “Localização da Lesão”.

Localização da lesão	
Articulação coxofemoral	0
Articulação femuro-tibio-patelar	1

Tabela 26: Tabela das escalas de dor e de claudicação à entrada e à saída dos casos em estudo.

ID do Animal	Escala de Dor		Classificação final da dor	Escala de Claudicação		Classificação final da claudicação
	Entrada	Última consulta de seguimento		Entrada	Última consulta de seguimento	
1	9	3	1	5	3	1
2	9	1	0	5	0	0
3	9	0	0	5	0	0
4	9	7	2	5	3	1
5	9	4	1	5	3	1
6	9	0	0	5	1	0
7	9	0	0	5	1	0
8	9	5	1	5	2	1

Tabela 27: Legenda da categorização da Classificação final da dor.

Classificação final da dor	
Dor ligeira	0
Dor moderada	1
Dor grave	2

Tabela 28: Legenda da categorização da Classificação final da claudicação.

Classificação final da dor	
Claudicação ligeira	0
Claudicação moderada	1
Claudicação grave	2

Tabela 29: Tabela com as medições do ROM em flexão e extensão ao longo do tempo dos casos em estudo.

ROM (em graus)									
Membro Pélvico Esquerdo									
F2	F3		F4		F5		Última consulta de seguimento		
	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão	
165	60	165	-	-	-	-	60	165	
160	50	155	50	155	50	155	50	155	
165	38	146	66	146	66	146	66	146	
-	-	-	-	-	-	-	32	158	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	
128	60	120	70	146	60	120	60	120	
128	40	128	40	110	40	120	40	120	
145	78	130	70	136	-	-	70	136	

Membro Pélvico Direito											
F5	Última consulta de seguimento		T0		T1		T2		F1		
Extensão	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão	Flexão
-	40	165	90	160	45	160	50	160	48	160	40
-	-	-	94	160	48	160	52	160	55	160	52
-	-	-	65	135	35	175	38	160	33	165	30
-	26	170	52	128	32	165	30	158	32	158	-
-	38	165	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	58	114	62	126	64	120	42	145	60	130	48
120	48	120	58	124	46	128	45	128	45	128	46
-	-	-	80	120	74	150	74	150	74	160	76

T1	T2		F1		F2		F3		F4	
Extensão	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão	Flexão	Extensão
160	44	160	36	160	40	165	40	165	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
180	28	170	26	170	-	-	-	-	-	-
165	38	165	-	-	-	-	-	-	-	-
148	62	120	60	110	60	114	58	114	60	116
126	55	132	52	120	52	120	48	120	46	112
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ID do Animal			
	T0		
	Flexão	Extensão	Flexão
1	45	160	47
2	-	-	-
3	-	-	-
4	50	140	28
5	52	170	30
6	54	142	64
7	56	114	54
8	-	-	-

Tabela 30: Tabela com as medições da Massa Muscular ao longo do tempo dos casos em estudo.

Massa Muscular (em cm)						
Membro Pélvico Esquerdo						
T2	F1	F2	F3	F4	F5	Última consulta de seguimento
34	39,5	42	49	-	-	49
37	45	47	50	52	54	54
44,1	44	44,5	45	48,5	49	49
21	20	-	-	-	-	20
-	-	-	-	-	-	-
35	35	37	36,5	36,5	37	37
33,5	36	36	34	32,5	33	33
41	44	43,5	43,5	41,5	-	41,5

Membro Pélvico Direito										
T0	T1	T2	F1	F2	F3	F4	F5	Última consulta de seguimento	T0	T1
37	37,3	38	40,5	40,2	39,5	-	-	39,5	33	33,8
-	-	-	-	-	-	-	-	-	36,6	37
-	-	-	-	-	-	-	-	-	44	43,8
18	22	21	20	-	-	-	-	20	20	20,5
33	28	29	-	-	-	-	-	29	-	-
33,7	34	35	35	35	36	36	36,5	36,5	37	35
37,5	36,5	37	35,5	36	35	37,7	38	38	32,5	32
-	-	-	-	-	-	-	-	-	39	40,5

ID do Animal			1	2	3	4	5	6	7	8
--------------	--	--	---	---	---	---	---	---	---	---

Anexo 13: Tabela De Identificação Dos Animais Incluídos No Estudo

Tabela 31: Identificação dos animais incluídos no estudo.

Identificação do Animal	Género	Idade	Raça	Peso	Condição Corporal (1 a 9)	Localização da lesão
1	Fêmea	8 anos	Boiadeiro de Berna	43,00 Kg	8	Articulação femuro-tibio-patelar
2	Fêmea	2 anos	Pastor Belga	35,00 Kg	5	Articulação coxofemoral
3	Macho	6 Anos	Pastor dos Pirinéus	55,500 Kg	8	Articulação coxofemoral
4	Fêmea	18 Anos	SRD	15Kg	5	Articulação femuro-tibio-patelar
5	Fêmea	17 Anos	SRD	17,000 Kg	5	Articulação coxofemoral
6	Fêmea	12 Anos	Pastor Alemão	34,00 Kg	5	Articulação coxofemoral
7	Fêmea	8 anos	Labrador	39,00 Kg	8	Articulação coxofemoral
8	Macho	5 anos	Pastor Alemão	46,5 Kg	8	Articulação coxofemoral